

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-503455

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)4月13日

(51) Int.Cl.⁶
A 61 K 35/12
31/70
48/00

識別記号
A D U
7431-4C
9454-4C
8314-4C
8314-4C
8314-4C

府内整理番号

F I

A 61 K 37/ 02
37/ 66

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-507903
(86) (22)出願日 平成4年(1992)10月23日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)4月25日
(86)国際出願番号 PCT/US92/08999
(87)国際公開番号 WO93/07906
(87)国際公開日 平成5年(1993)4月29日
(31)優先権主張番号 781, 356
(32)優先日 1991年10月25日
(33)優先権主張国 米国 (U.S)
(31)優先権主張番号 863, 641
(32)優先日 1992年4月3日
(33)優先権主張国 米国 (U.S)

(71)出願人 サン ディエゴ リージョナル キャンサー センター
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121,
サン ディエゴ, スイート 200, サイエンス パーク ロード 3099
(72)発明者 ソボル, ロバート イー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
ラ ホヤ, ラ ホヤ ハーモサ アベニュー 5673
(72)発明者 ゲイジ, フレッド エイチ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
ラ ホヤ, カミニート ヘレーチョ 8388
(74)代理人 弁理士 山本 秀策
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌のリンホカイン遺伝子療法

(57)【要約】

腫瘍の免疫療法の新規な方法を記載する。この免疫療法は、サイトカイン遺伝子産物の分泌を引き起こし、腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を刺激する細胞の遺伝的改変を包含する。1つの実施態様では、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変された自己の線維芽細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、腫瘍性抗原を伴う製剤形態で被験体を免疫処置するために使用する。別の実施態様では、少なくとも1種の腫瘍性抗原生産物を発現し、そして少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変された細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、被験体を免疫処置する製剤形態で使用する。

特表平7-503455 (2)

請求の範囲

1. 被験体の癌を処置する方法であつて、腫瘍性抗原、および、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたCE細胞を含有する製剤形態で、活性腫瘍部位以外の部位において、該被験体を免疫処置することにより、癌に対する該被験体の免疫応答を刺激する工程を包含する、方法。
2. 前記被験体からあらかじめ単離された腫瘍細胞が、前記腫瘍性抗原を提供する、請求項1に記載の方法。
3. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
4. 1種のサイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項3に記載の方法。
5. CE細胞を生産するために、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子が組換え法により細胞中に転移される、請求項1に記載の方法。
6. 前記サイトカイン遺伝子が、発現ベクター中に存在する、請求項5に記載の方法。
7. 前記発現ベクターが、自殺遺伝子をさらに含有する、請求項5に記載の方法。

およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

1. 1種のサイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項1-2に記載の組成物。
2. 各サイトカイン遺伝子が、免疫応答を刺激するのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのには十分に低いレベルで発現される、請求項1に記載の組成物。
3. 前記形質導入の工程において、前記レトロウイルス発現ベクターが、IL-2の持続分泌を引き起こすプロモーターを有する、請求項9に記載の方法。
4. 前記レトロウイルス発現ベクターが、10日またはそれ以上の期間、少なくとも4単位/日のIL-2の分泌を引き起こす、請求項1-5に記載の方法。

8. 前記CE細胞が、線維芽細胞および抗原提示細胞から生産される、請求項5に記載の方法。

9. 癌に対する被験体の免疫応答を高める方法であつて:
 - a) 該被験体から線維芽細胞を単離する工程;
 - b) インビトロで、該線維芽細胞を培養する工程;
 - c) レトロウイルス発現ベクター中に、IL-2をコードする遺伝子および腫瘍性抗原をコードする遺伝子を含有するレトロウイルス発現ベクターを用いて、該線維芽細胞を形質導入して、該線維芽細胞により、該腫瘍性抗原を発現し、そして、該IL-2を発現および分泌する工程; および
 - d) 活性腫瘍部位以外の部位において、免疫応答を高めるのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのに十分に低いレベルでIL-2を発現し、そして該腫瘍性抗原を発現する該線維芽細胞を用いて、該被験体を免疫処置する工程、を包含する、方法。

10. 前記線維芽細胞が、自家遺伝子を発現するように、さらに改変される、請求項9に記載の方法。

11. 肿瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を高める組成物であつて、該組成物が、腫瘍性抗原、および、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたCE細胞を含有する、組成物。

12. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、

明細書

癌のリンホカイン遺伝子療法

背景

本出願は、1991年5月25日に出願された米国特許出願第01/120,872号の一部継続出願である1991年10月26日に出願された米国特許出願第01/181,355号の一部継続出願である。両出願とも本明細書中に、全体が援用されている。

免疫系の生物学の我々の理解における近年の進歩は、サイトカイン(1-3)と呼ばれる免疫応答の重要なモジュレーターを同定するに至った。リンパ球により産生される免疫系モジュレーターが、リンホカインと名付けられており、サイトカインのサブセットのことである。これらの薬剤は、抗腫瘍免疫に関与する多くの免疫応答を媒介する。数種のこれらのサイトカインが、組換えDNA法により生産され、それらの抗腫瘍効果について評価されてきた。リンホカインおよび関連する免疫モジュレーターの投与は、種々の新生物を伴う被験体に、目的の腫瘍応答を引き起こす(4-7)。しかしながら、現在の様式でのサイトカイン投与は、これらの薬剤の治療上の価値を限定する毒性をしばしば伴う。

例えば、インターロイキン-2(IL-2)は、抗腫瘍免疫の獲得において重要なリンホカインである(4)。腫瘍性抗原に対する応答で、ヘルパーT細胞と名付けられるリンパ球のサブセットが、少量のIL-2を分泌する。このIL-2は、腫瘍性抗原刺激部位で局所的に作用して、全身的な腫瘍細胞破壊を媒介

特表平7-503455 (3)

する細胞障害性T細胞およびナチュラルキラー細胞を活性化する。IL-2の静脈内、リンパ管内および病巣内投与は、数名の患者に臨床的に重大な応答を引き起こした(4-6)。しかしながら、激しい毒性(低血圧およびアデノーマ(adema))により、静脈内およびリンパ管内IL-2投与の投与量および効能が制限される(5-7)。全身的に投与されたリンカインの毒性は、これらの薬剤が局所的な細胞の相互作用を媒介し、そして通常非常に小量しか分泌されないので驚くべきものではない。

さらに、インターロイキン-4(IL-4)、アルファインターフェロン(α -IFN)およびガムマインクーフェロン(γ -IFN)のような他のサイトカインが、腫瘍細胞に対する免疫応答を刺激するために使用してきた。IL-2と同様に、現在の様式での投与は、不利な副作用を有する。

全身的サイトカイン投与の毒性を回避するために、幾人かの研究者が、IL-2の病巣内注入を研究した。このアプローチは、全身的IL-2投与に関係する毒性を排除する(8,9,10)。しかしながら、多数回の病巣内注入には、治療効能を最適化することが要求される(9,10)。従って、多くの被験体に対して、特に、死亡する可能性を伴わずに注入が腫瘍部位に到達できない場合、これらの注入は実用的でない。

代替的なアプローチは、腫瘍細胞中へのサイトカイン遺伝子の転移を包含し、数種の動物腫瘍モデルで重大な抗腫瘍性免疫応答を引き起こした(11-14)。これらの研究では、同系の宿主に移植された場合、サイトカイン遺伝子の腫瘍細胞中へ

の転移に続くサイトカイン遺伝子産物の発現は、サイトカイン分泌腫瘍細胞の腫瘍形成性を停止させた。IL-2(11,12)、 γ -IFN(13)またはインターロイキン-4(IL-4)(14)に対する遺伝子の転移は、いくつかの異なる組織学的タイプのネズミの腫瘍の成長を、著しく減少させたかまたは排除した。IL-2遺伝子転移を用いる研究において、処置された動物はまた、全身的な抗腫瘍性免疫を獲得し、改変されていない粗腫瘍による以後の腫瘍性の攻撃に対して保護された(11,12)。非改変粗腫瘍細胞と、IL-2遺伝子を発現するように設計された遺伝的に改変された腫瘍細胞との混合を用いて、免疫処置を行い腫瘍成長の類似の阻害および防御免疫もまた証明された。これらの動物腫瘍の研究では、局所的なリンカインの転移遺伝子の発現に関する毒性は、全く報告されていない(11-14)。

上記の遺伝子転移処理は、抗腫瘍性免疫を提供することが示されたが、未だ実用上の困難を有している。ほとんどの被験体の腫瘍がインピトロでの増殖のために樹立されておらず、ヒトのインビボでの遺伝子転移の方法も使用され得ないので、機能を有するサイトカイン遺伝子を、多数の被験体の腫瘍細胞中に転移できないことにより、このアプローチは制限される。

説明の要旨

本発明は、新規で、より実用的なサイトカインの癌免疫治療の方法を示す。あるアプローチでは、例えば、日常的な皮

膚バイオプシーから得られる線維芽細胞のような被験体由来の選択された細胞が、遺伝的に改変されて、1種またはそれ以上のサイトカインを発現する。または、マクロファージ、単球およびリンパ球のような、通常は免疫系において抗原提示細胞として働き得る被験体の細胞もまた、1種またはそれ以上のサイトカインを発現するように遺伝的に改変され得る。以後、これらの改変細胞を、サイトカイン発現細胞、またはCE細胞と呼ぶ。次いで、このCE細胞を、例えば、照射腫瘍細胞の形態で、または精製された天然または組換え腫瘍性抗原の形態で、被験体の腫瘍性抗原と混合し、例えば皮下法のような、免疫処置において使用して、全身的な抗腫瘍性免疫を誘発する。

サイトカインは、活性腫瘍部位以外の部位での局所的な免疫処置により、全身的な抗腫瘍性免疫応答を誘発しまたは高めるのに十分なレベルで、局所的に発現される。サイトカイン投与に関係する全身的な毒性は、起こらない。なぜなら、CE細胞により分泌されるサイトカインのレベルは、全身的なサイトカイン濃度に大きく影響しないからである。

CE細胞により分泌されるサイトカインの量は、抗腫瘍性免疫を誘発するには十分であるが、実質的な全身的な毒性を生じさせるよりもずっと少ないので、このアプローチは、局所的なサイトカイン投与という長所を提供する。さらに、この新規な方法は、死亡をまねき得る病巣内注入の必要性を除く。さらに、免疫処置の部位でのサイトカインの遺伝的な局所的

発現もまた、断続的なサイトカイン注入と比較して、抗腫瘍性免疫応答を高め得る。この方法はまた、わずらわしい静脈内注入と対照的に、CE細胞を用いる局所的な免疫処置という長所を提供する。この方法はまた、インピトロで腫瘍細胞系を樹立する必要性、および遺伝子をこれらの腫瘍細胞に転移する必要性を排除する。

本発明はまた、サイトカインの局所的な発現の代替法をも提供し、サイトカインおよび腫瘍性抗原の両方の細胞発現の遺伝的改変を介して、被験体の腫瘍に対する免疫応答を誘発しおよび/または高める。本実施態様では、被験体由来の選択された細胞は、単離され、そして、サイトカイン遺伝子、および腫瘍性抗原をコードする遺伝子を用いて形質導入される。形質導入細胞を、「キャリアー細胞」と呼ぶ。キャリアー細胞は、線維芽細胞、および通常は、マクロファージ、単球およびリンパ球のような免疫系で抗原提示細胞として働く細胞を包含し得る。サイトカインおよび腫瘍性抗原の両方を活発に発現している形質導入細胞が、選択され、活性腫瘍部位以外の部位での局所的な免疫処置において使用されて、抗腫瘍性免疫応答を誘発する。CE細胞と共に用いた場合と同様に、キャリアー細胞により分泌されるサイトカインのレベルが、全身的なサイトカイン濃度に有意に影響を与えないで、これらのキャリアー細胞は実質上の全身的な毒性を生じない。この代替法となる実施態様は、時に困難である腫瘍のサンプルの入手の必要を省くため有利である。しかしながら、キャ

リヤー細胞は、局所的な免疫処置において、腫瘍細胞、腫瘍細胞ホモジネート、精製腫瘍性抗原、または組換え腫瘍性抗原と共に使用され得、これによって抗腫瘍性免疫が高められる。

さらに、この第2の実施態様は、第1の実施態様と同じ長所を有し、その長所とは、キャリアー細胞により放出されたサイトカインのレベルが、抗腫瘍性免疫を誘発するには十分であるが、実質上の全身的な毒性を生じさせるよりはずっと低いことである。さらに、第1の実施態様と同様に、この方法は、病巣内注入の必要性を省き、サイトカインを連続的に発現させる。この方法はまた、腫瘍細胞のインヒトロでの連続培養を樹立する必要性、およびこれらの腫瘍細胞中へ遺伝子を転移する必要性を排除し、そしてわずらわしく長い静脈内注入とは対照的に、キャリアー細胞を用いる局所的な免疫処置という長所を提供する。

これらのアプローチはまた、医療業務の他の分野において、臨床的に重要な他の抗原に対する免疫応答を誘発しまたは高める用途を見出しえる。

図面の簡単な説明

図1は、レトロウイルスベクターDC/TKIL2、LXSN-IL2、およびLNCI-IL2の模式図を示す。

図2は、ELISAで測定された1回上清サンプルのIL-2平均濃度を示す。上清は、約 1.5×10^6 個の半集密的な線維芽細胞の度を示す。

した。

図7は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、 5×10^4 個のCT26腫瘍細胞と 2×10^6 個の線維芽細胞とを混合して用い、各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に注目した。

図8は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、 1×10^5 個のCT26腫瘍細胞と 2×10^6 個の線維芽細胞とを混合して用い、腫瘍の成長速度に注目した。

図9は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、 1×10^5 個のCT26腫瘍細胞と 2×10^6 個の線維芽細胞とを混合して用い、各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に注目した。

図10は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変細胞の効果を示す。ここでは、 1×10^5 個の改変されていないCT26と 2×10^6 個のDCTK-IL2改変CT-26腫瘍細胞とを混合して用い、 1×10^5 個のCT26と混合した 2×10^6 個のDCTK-IL2改変線維芽細胞と比較し、腫瘍の成長速度に注目した。

図11は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変細胞の効果を示す。ここでは、 1×10^5 個の改変されていないCT26と 2×10^6 個のDCTK-IL2改変CT-26腫瘍細胞とを混合して用い、 1×10^5 個のCT26とに混合した 2×10^6 個のDCTK-IL2改変線維芽細胞と比較し、各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に注目した。

1晩培養から採取した。

図3は、形質導入線維芽細胞により分泌されたIL-2の生物学的活性を示す。これは、上清の3回サンプルと共にインキュベートされたIL-2改変CT細胞系への³H-TdRの平均取り込み量を測定することで実証された。上清は、約 1.1×10^6 個の半集密な線維芽細胞の1晩培養から採取された。

図4は、以下の動物間の比較を示す： 10^6 個のCT26腫瘍細胞のみを注入された動物（□）； 10^6 個のCT26腫瘍細胞および 2×10^6 個の改変されていないBALB/C線維芽細胞を注入した動物（■）； 10^6 個のCT26腫瘍細胞および 2×10^6 個のIL-2形質導入BALB/C線維芽細胞を注入した動物（●）； 10^6 個のCT26腫瘍細胞および 1×10^6 個の形質導入BALB/C線維芽細胞を注入した動物（○）。腫瘍の測定値は、各処置群における4匹の動物の腫瘍の横断直径の平均度物である。（*）は、腫瘍の成長曲線の統計学的に有意な差異（P<0.05）を示す。

図5は、キオマイシンホスホラーゼのDNA配列のPCR分析を示す。レーン1～陽性コントロールpLXSH-B1-IL2。レーン2から4は、ゲノムDNAをテストする；レーン5および6、卵巣のゲノムDNA；レーン7、陰性コントロール。DNAなし。肝臓、脾臓、および肺のゲノムDNAを用いても同一の結果が得られた（データは示していない）。

図6は、腫瘍の定着および発達に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、 5×10^4 個のCT26腫瘍細胞と 2×10^6 個の線維芽細胞とを混合して用い、腫瘍の成長速度に注目

した。

図12は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および腫瘍の成長速度に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10^4 個の新鮮な腫瘍細胞を投与する7日前に、 2.5×10^5 個の照射CT26腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

図13は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および各処置群での、動物個体に対する腫瘍の発現時間に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10^4 個の新鮮な腫瘍細胞を投与する7日前に、 2.5×10^5 個の照射CT26腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

図14は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および腫瘍の成長速度に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10^4 個の新鮮な腫瘍細胞を投与する14日前に、 2.5×10^5 個の照射CT26腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

図15は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10^4 個の新鮮な腫瘍細胞を投与する14日前に、 2.5×10^5 個の照射CT26腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

詳細な説明

腫瘍免疫療法の新規な方法は、サイトカイン遺伝子導入の誘発を引き起こし、腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を

特表平7-503455 (5)

刺激する細胞の遺伝的変化を含むと記載される。本明細書中で、「遺伝子」は、所望のタンパク質をコードするヌクレオチド配列であると定義される。ある実施態様では、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分秘するように遺伝的に変化された自己の線維芽細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、被膜体を免疫処置するために、腫瘍性抗原を含有する製剤形態で使用する。他の実施態様では、少なくとも1種の腫瘍性抗原遺伝子産物を発現し、そして少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分秘するように遺伝的に変化された細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、被膜体を免疫処置するために製剤形態で使用する。好適には、サイトカインは、これらのタンパク質を周囲の環境に効果的に分泌する細胞において発現される。線維芽細胞は、このような細胞の例である。線維芽細胞および他の細胞は、本明細書中に後に記載のように、遺伝的に変化され得、1種またはそれ以上のサイトカインを発現し分泌する。

腫瘍性抗原は、以下を包含するいくつかの方法で提供され得るが、それらに限定されない：1)CE細胞に、腫瘍性抗原をコードする遺伝子で、形質導入し得る。次いで、これらの「キャリアー細胞」を、被膜体の免疫処置に使用する。2)適切な腫瘍性抗原をコードするクローニング遺伝子配列を、線維芽細胞または抗原提示細胞のような細胞中に、転移し得る。次いで、これらの細胞を、CE細胞またはキャリアー細胞と混合し、被膜体を免疫処置する。3)腫瘍性抗原を、細胞または他

のタイプの細胞中で、組換え処理によりクローニングし得る。次いで、これらの抗原を精製し、CE細胞および／またはキャリアー細胞を用いる免疫処置に使用する。4)腫瘍性抗原を、腫瘍細胞から精製し得、CE細胞またはキャリアー細胞を用いて被膜体を免疫処置するために使用し得る。5)腫瘍細胞を、被膜体の免疫処置のために、照射し得、あるいは機械的に破碎し得、そしてCE細胞および／またはキャリアー細胞と混合し得る。

本発明は、以下の工程を包含する：(A)CE細胞またはキャリアー細胞の生産に適切な細胞を単離する工程；(B)サイトカイン遺伝子を単離する工程、またはサイトカイン遺伝子および腫瘍性抗原遺伝子ならびに適切なマーカー遺伝子および／または自殺遺伝子を単離する工程；(C)(B)から得た遺伝子を転移し、CE細胞またはキャリアー細胞を生成する工程；(D)CE細胞またはキャリアー細胞を用いて免疫処置するために、被膜体の腫瘍性抗原または他の適合する腫瘍性抗原の免疫学的サンプルを調製する工程；(E)免疫処置のために腫瘍細胞を腫瘍性抗原の供給源として用いる場合、その腫瘍細胞の悪性の潜在力を不活性化する工程；および(F)免疫処置用のサンプルを調製する工程。以下は、発明者らにより考慮されたいくつかの実施態様である。しかしながら、当業者に周知のいかなる手段も、これらの工程を達成するために、本発明において使用し得ることが理解される。

(A)CE細胞およびキャリアー細胞を生産するための細胞の選択

CE細胞およびキャリアー細胞として使用される細胞は、被膜体の体の種々の位置から選択され得る。例えば、皮膚バンチバイオブレーは、被膜体へ最小量で侵入させることにより、CE細胞の生産用の線維芽細胞が容易に入手され得る供給源を提供する。または、これらの線維芽細胞は、腫瘍サンプル自身から入手され得る。造血由来の細胞は、静脈穿刺、骨髄吸引、リンパ節バイオブレー、または腫瘍サンプルから得られる。CE細胞またはキャリアー細胞の生産用の他の適切な細胞は、当業者に周知の手段により単離され得る。同様に選択され、そして処理される非自己の細胞もまた、使用され得る。

(B)遺伝子の単離

非常に多くのサイトカイン遺伝子が、クローニングされ、本プロトコルにおける使用に有効である。IL-2、γ-INFおよび他のサイトカインの遺伝子が、容易に使用され得る(1-5, 11-14)。適切な腫瘍性抗原のクローニング遺伝子は、当該分野で周知の手段により単離される。

ネオマイシン抵抗性(Neo^R)のような選択可能なマーカー遺伝子が、容易に入手され得る。選択可能なマーカー遺伝子の組み込みにより、所望の遺伝子を首尾よく受容し、発現した細胞の選択が可能になる。遺伝子転移技術の当業者に周知の他の選択可能なマーカー遺伝子もまた、所望の転移遺伝子を発現するCE細胞またはキャリアー細胞の生産に使用され得る。

「自殺」遺伝子は、免疫応答の刺激後に、選択的に誘導可能な致死を生じさせるために、CE細胞またはキャリアー細胞中に組み込まれ得る。単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子(TK)のような遺伝子は、CE細胞またはキャリアー細胞の誘導可能な崩壊を引き起こすために使用され得る。CE細胞またはキャリアー細胞が、もはや有効でなくなった場合、アシクロビルまたはガムシクロビルのような薬剤が投与され得る。これらの薬剤はいずれも、TKを発現する細胞を選択的に殺し、それにより、移植された形質導入された細胞を除去する。さらに、自殺遺伝子は、誘導可能なプロモーターに結合した非分泌細胞障害性ポリペプチドをコードする遺伝子であり得る。CE細胞またはキャリアー細胞の崩壊が所望とされる場合、自殺遺伝子が細胞障害性ポリペプチドの生産を誘導し、その結果CE細胞またはキャリアー細胞を殺すように、プロモーターの適切な誘発物質を投与する。しかしながら、CE細胞またはキャリアー細胞の崩壊は、必ずしも必要とされるわけではない。

所望の腫瘍性抗原をコードする遺伝子は、組換え法によりクローニングされ得る。多数の腫瘍により発現される抗原のコード配列は、多数の被膜体に使用され得る。

(C)遺伝子の転移

培養細胞中に遺伝子を転移するために、非常に多くの方法が、使用され得る(15)。例えば、適切な遺伝子を、プラスミドまたはレトロウイルスのようなベクター中に挿入し得、そ

特表平7-503455 (6)

して細胞中に転移し得る。エレクトロボレーション、リポフェクションおよび種々の他の方法が、当該分野で知られており、用いられ得る。

遺伝子転移の1つの方法は、以前のヒト遺伝子転移の研究において用いられた方法と同様の方法であり、腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte)(TIL)を、レトロウイルス遺伝子形質導入により改変し、被膜細胞に投与した(16)。このレトロウイルス介在遺伝子転移の第1段階の安全性の研究において、TILを遺伝的に改変して、ネオマイシン抵抗性(Neo^R)遺伝子を発現させた。静脈内注入を行った後、ポリメラーゼ連鎖反応分析では、投与後2ヶ月の間、一貫して被膜中に遺伝的に改変された細胞が見出された。感染性レトロウイルスは、これらの被膜細胞中には全く検出されず、そして、遺伝子転移による副作用は、どの被膜細胞中にも見られなかつた(16)。これらのレトロウイルスベクターを改変し、ウイルスのgag、polおよびenv遺伝子の削除によりウイルスの複製を防止した。

レトロウイルスを遺伝子転移に使用する場合、複製受容能を有するレトロウイルスが、レトロウイルスベクターを生産するために使用されるパッケージング細胞系において、レトロウイルスベクターおよびウイルス遺伝子配列の間での組換えにより理論的に発生する。我々は、組換えによる複製受容能を有するウイルスの生産が減少したまたは排除されたパッケージング細胞系を使用する。のことから、被膜細胞を

感染させるのに使用されるすべてのレトロウイルスベクターの上清を、PCRおよび逆転写酵素アッセイのような標準的なアッセイにより、複製受容能を有するウイルスに対しスクリーニングする(16)。さらに、複製受容能を有するウイルスに曝すことが、必ずしも有害であるとは限らない。複製受容能を有するマウスレトロウイルスの多量の接種物を注入した腫瘍の研究において、そのレトロウイルスは、腫瘍の免疫系により辨別された(17)。複製受容能を有するウイルスに原因する疾病または後遺症は、曝した3年後にはまったく観察されなかつた。要約すると、被膜細胞が複製受容能を有するマウスレトロウイルスに曝されることは予期されず、そしてそのように曝されることが、必ずしも有害ではないと思われる(17)。

(D) 被膜細胞の腫瘍性抗原または精製組換え腫瘍性抗原の免疫学的サンプルの調製

腫瘍の関係する抗原を有する腫瘍細胞が、被膜細胞から単離される。これらの細胞は、固形癌または白血病性腫瘍の一方に由来する。固形癌については、単細胞懸濁液が、バイオブシー組織の機械的分離および洗浄により作られ得る(18)。

造血器腫瘍は、末梢血液または骨髄から、標準的な方法で単離され得る(19)。

第二の変型は、腫瘍細胞のホモジネートの使用である。このようなホモジネートは、本発明による刺激があつた際に、被膜細胞の免疫系により認識するのに有用な腫瘍性抗原を

含有し得る。例えば、細胞を機械的に破壊することで、あるいは凍結し融解することで作られる非分画細胞ホモジネート、または、好みしくは濃縮レベルの腫瘍性抗原を伴うホモジネートの部分が使用され得る。

同様に、例えば免疫沈降法またはDNA組換え法により得られた精製腫瘍抗原が使用され得る。次いで、精製抗原は、上記のCE細胞および/またはキャリアー細胞と共に免疫処置に使用され、これらの抗原に対する被膜細胞の免疫応答を誘発したまは高める。

キャリアー細胞を使用する実施態様では、腫瘍性抗原は、キャリアー細胞による発現中ずっと使用され得る。これらのキャリアー細胞は、単独で、または、他の腫瘍性抗原調製物またはCE細胞と共に注入され得る。同様に、CE細胞が用いられる場合は、当該分野で周知の方法で生成された精製組換え腫瘍性抗原が使用され得る。

自己の腫瘍細胞が容易に入手され得なければ、異種の腫瘍細胞、それらのホモジネート、それらの精製抗原、またはそのような抗原を発現しているキャリアー細胞が使用され得る。

(以下余白)

(E) 腫瘍細胞の不活性化

生存可能な腫瘍細胞を、腫瘍性抗原の供給源として免疫処置に使用する場合、腫瘍細胞は、被膜細胞中で増殖しないよう不活性化され得る。不活性化は、いくつかの方法で達成され得る。細胞は、免疫処置の前に照射され得る(18)。この照射は、それらの複製を阻止するレベルであり得る。次いで、このような生存可能な細胞は、それらの腫瘍性抗原を、被膜細胞の免疫系に提供し得るが、新しい腫瘍を形成するほどには増殖し得ない。

または、培養され得る腫瘍細胞は、自家遺伝子を形質導入され得る。上記のように、単純ヘルペスチミジンキナーゼ(TK)のような遺伝子を、腫瘍細胞に転移し、アシクロビルまたはガンシクロビルの投与により、それらの崩壊を誘導し得る。免疫処置の後、TK発現腫瘍細胞は、それらの腫瘍性抗原を提供し得、増殖し得る。被膜細胞の免疫応答が刺激される期間の後、この細胞は選択的に殺され得る。おそらく、このアプローチは、免疫処置に使用される腫瘍細胞をより長く生存させる。そして、このことは、抗腫瘍性免疫を誘導したまは高めることに有利である。

(F) 免疫処置のための試料の調製

CE細胞および/またはキャリアー細胞および腫瘍細胞、および/または腫瘍細胞のホモジネートおよび/または精製腫瘍性抗原、を患者の免疫処置のために結合する。約10⁷個の腫瘍細胞が必要とされる。腫瘍細胞のホモジネート、また

特表平7-503455 (7)

実施例1

照射腫瘍細胞と混合した

IL-2を発現する線維芽細胞による免疫処置

IL-2分泌CE細胞の生産に使用する

自己の線維芽細胞の用意

皮膚バンチバイオブレーを、無菌条件下で各被験体から得る。そのバイオブレー組織を細断し、10%のウシ胎児血清を含有する RPMI1640培地(または類似の培地)に入れ、培養において皮膚線維芽細胞の成長を樹立する。この培養線維芽細胞は、レトロウイルス介在 IL-2 遺伝子転移により IL-2 分泌 CE 細胞を生産するために使用する。

2) レトロウイルスベクターの開発

および IL-2 分泌 CE 細胞の生産

次いで、培養皮膚線維芽細胞を、IL-2 およびネオマイシン抵抗性(Heo^R)遺伝子を含有するレトロウイルスベクターに感染させる。Neo^R 遺伝子を含有する N1 ベクターを使用し、このベクターは、これまで多数の研究者により、ヒトを題材とする研究(16)を含み、インビトロおよびインビオの研究に使用されてきた。この N1 ベクターは、N1 由来のベクターである、Friedmann およびその共同研究者により開発され記載された LBLNL から生産される(10)。それは、LLBNL のルシフェラーゼ遺伝子を、ヒト IL-2 をコードする完全長の cDNA と置換すること

は腫瘍性抗原の精製または非精製画分を用いるとき、腫瘍の用量を、10⁷ 個の未処理の腫瘍細胞で通常存在する腫瘍性抗原の正常数に基づいて調整し得る。腫瘍の調製は、治療を妨げる実質的に全身的な毒性を生ずることなく、抗腫瘍免疫性(1-12)を誘起するサイトカインのレベルを分離するのに十分な数の CE またはキャリアー細胞を混ぜすべきである。

サイトカインは、CE 細胞またはキャリアー細胞により、免疫応答を誘起または増大するのに十分であるが、実質的に全身的な毒性を避けるのには十分ではないレベルで、生成されるべきである。これにより、サイトカインの生理学的レベルより大きい従来の方法の投与により生じる副作用を防ぐ。

これらの混合物、および单独で使用されるキャリアー細胞は、注入のために、当該分野で既知であって、免疫処置に受容可能な、どのような様式にも製剤され得る。少なくとも CE 細胞およびキャリアー細胞が、生存可能であることが重要なので、この製剤は細胞の生存に適合しなければならない。製剤は、皮下注射、筋内注射され得、または免疫処置に受容可能な様式の注入もなされ得る。

免疫応答を望ましくない抗原に集中させ得る調製物中の汚染物質は、免疫処置の前に除去しなければならない。

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態の説明のために提供するもので、本発明の範囲を限定するものと解すべきではない。

で作られる。汚染性で複製受容能を有するウイルスを含まないレトロウイルスベクターを、ベクタープラスマド標識物をヘルパー・リバッケージング細胞系 PA317 中にトランスクレクトすることで生産する。被験体細胞の感染の前に、このベクターが、ヘルパー・ウイルスを含まないことが示される。ヘルパー・ウイルスが検出される場合、そのベクターを、ウイルスの gag および pol 遺伝子が env から離れている G418-AM12 リバッケージング細胞系中で生産し、ヘルパー・ウイルス生産の可能性をさらに減少させる。

1) 形質導入プロトコル

培養始原線維芽細胞を、(20)に記載のように、パッケージング細胞系由来の上清と共にインキュベートする。これらの細胞由来の上清を、外因性因子および複製受容能を有するウイルスについて、(16)に記載のように試験し、表 1 に概要を示す。この線維芽細胞を、洗浄し、次いで G418(ネオマイシン類似物)を含有する培地中で増殖させ、Neo^R 遺伝子を発現している形質導入細胞を選別した。この G418 抵抗性細胞を、固相酵素免疫測定法(ELISA)により培養の上清中の IL-2 の濃度を測定することで、IL-2 遺伝子の発現について試験する(12)。IL-2 を発現している G418 抵抗性(resistant)細胞は、-70°C で、以後、免疫処置に使用するために必要になるまで貯蔵する。

表 1
外因性因子および安全性試験

1. 無菌度
2. マイコプラズマ
3. 一般的安全性
4. ウィルス試験

LCH ウィルス
胸膜因子(Thyroid agent)
S+/L- eco
S+/L-xeno
S+/L- aspho
STS 増幅
MRC-5/Vero

2) 照射腫瘍細胞の開発

臨床的に示唆される外科的な切除から、または残りんパ節または皮膚転移から得られた腫瘍を、2~3mm の細片に細断し、コラーゲナーゼおよび DNase で処理し、単細胞懸濁液中への腫瘍の分離を容易にした。集めた細胞を、遠心分離し、RPMI1640 培地中で洗浄し、次いで、10% のジメチルスルホキシドおよび 50% のウシ胎児血清を、RPMI1640 培地中に含有する培地中で冷凍保存する。これらの細胞は、投与のときまで液体窒素中に貯蔵する。皮下免疫処置において使用する前に、これらの細胞を、解凍し、免疫原性汚染物質を含まない培地中で

特表平7-503455 (8)

洗浄し、そして、セシウム照射装置中で、4,000ラド／分、総線量20,000ラドの照射をした。

5)被膜体の選択

被膜体は、組織学的に確認された癌の診断を有する。治療の目的で切除する必要のある腫瘍、または、バイオプシーが容易に接近し得る腫瘍を有する被膜体は、本発明の本実施例に最も適切である。

6)処置前評価

以下の処置前評価を、実施した。

1) 病気の活動度の記載および定量化を包含する病歴および身体検査。

2)動作の状態の評価(Performance Status Assessment)

- 0・正常、無症状
- 1・制限あり、しかし、通常可
- 2・覚醒時の50%以上、起床している、自服务能力あり
- 3・覚醒時の50%以上、ベッドまたは椅子から離れない固定された自服务能力
- 4・寝たきり

3) 処置前実験

分離でのCBC(CBC with differential)、血小板数、PT、PTT、グルコース、BUN、クレアチニン、電解質、SGOT、SGPT、LDH、アルカリホスファターゼ、ビリルビン、尿酸、カルシウム、総タンパク質アルブミン。

ム、総タンパク質アルブミン。

4)他の分析:

尿分析

Crea、CrおよびCr₁血清補体レベル、

末梢血液B細胞およびT細胞サブセットの免疫表現型分析(*immunophenotyping*)

末梢血液細胞における検出可能な複製受容能を有するウイルスに対するアッセイ

Neo^R、IL-2およびウイルスenvについての、末梢血液白血球のPCRアッセイ

5)他の処置前評価:

胸部X線および、コンピューター運動断層撮影(CT)、磁気共鳴画像法(MRI)または放射性核種スキャンを包含する他の診断的研究を、疾患の活動の程度を記録し、定量化するために実施し得る。

これらの評価に統いて、一定の間隔(約1~3ヶ月毎)で、治療の過程中に行う評価が、治療および潜在的な毒性に対する応答を測定することに有用であり、その評価により、施される免疫処置の回数が調整される。

7)並立療法の制限

この処置の効果を最良にするために、被膜体は、免疫系を抑制することが知られている並立療法を受けるべきではない。

8)最終の処方

各被膜体は、照射腫瘍細胞とIL-2を分泌するように遺伝的に改変された自己の線維芽細胞CB細胞との混合物を用いる皮下免疫処置を受ける。約10⁷個の腫瘍細胞を、組織培養において、半集密的な場合少なくとも20単位/mlのIL-2を分泌することが知られている10⁷個の線維芽細胞と混合する(12)。この照射腫瘍細胞および遺伝的に改変された線維芽細胞を、免疫処置のために、最終容積が0.3mlになるように通常生理食塩水を入れる。

9)投与量の調整

2週間隔して、照射腫瘍細胞、および、IL-2を分泌するように遺伝的に改変された自己の線維芽細胞を用いて、少なくとも2回の皮下免疫処置を施す。毒性がまったく観察されなければ、引続き、追加免疫処置を定期的(少なくとも1週間隔して)に施し、抗腫瘍性免疫応答を最適化し得る。

10)潜在的毒性の処置

これらの免疫処置から、有毒な副作用が起こることは予想されない。しかしながら、これらの免疫処置の潜在的な副作用は、以下の様式で処置可能である:

大量の腫瘍細胞溶解が起これば、その結果起ころる尿酸キプロバシー、成人呼吸促進症候群、汎発性血管内凝固症候群またはカリウム過剰血症は、標準的な方法により処置される。

免疫処置の部位の局所的毒性は、局所ステロイドおよび/または適切と思われる注入部位の外科的な切除で処置される。

悪寒、発熱および/または発疹のような過敏反応は、対症療法的に、解熱薬および抗ヒスタミン剤を用いて処置される。被膜体は、予防薬を用いて処置されるべきではない。関節痛、リンパ節腫または腎機能不全が起った場合、コルチコステロイドおよび/または抗ヒスタミン剤での処置を始める。アナフィラキシーは、エビネフリン、波体、およびステロイドの投与のような標準的手段により処置される。

(以下余白)

特表平7-503455 (B)

実施例III

A. 線維芽細胞中のレトロウイルス-LTR-2遺伝子転写および発現

マウスおよび初代ヒト線維芽細胞中でIL-2およびネオマイシンホスホトランスクレオチド遺伝子を転写して発現するのに、レトロウイルスベクターを使用した。Gilibosおよび共同研究者らによって生成されたレトロウイルスベクターDC/TKI-L2(Gansbacherら、J.Exp.Med.,172:1217-1223,1990、これは本明細書中に参考として援用されている)を利用して動物腫瘍モデルにおいて適用するためにマウス線維芽細胞に形質導入した(以下のB項を参照のこと)。ヒト線維芽細胞を、レトロウイルスベクター-LXSN-RI-IL2を用いて形質導入した。これらのレトロウイルスベクターの構造の概略図を図1に示す。LXSN-RI-IL2ベクターのより完全な記載を、そのヌクレオチド配列を含めて、実施例IIIおよび表2、3および4に示す。

上記のベクターを用いた感染およびネオマイシン類似体G418を含有する増殖培地での2~3週間の選択に統いて、Balb/cおよびヒト線維芽細胞上清を採取し、そして固相酵素免疫測定法(ELISA)によって、IL-2についてテストした。図2は、形質導入された線維芽細胞により分泌されたIL-1のレベルを表す。

これらの結果は、ルシフェラーゼまたはβ-ガラクトンダーゼのような不適切な遺伝子を発現するN2由来レトロウイルスベクターで感染したネガティブコントロールの線維芽細胞、

および成人ヒト線維芽細胞を用いた研究を用いて確認し得る。

形質導入したヒト線維芽細胞により発現したIL-1の生物学的活性を、IL-2依存性T細胞系を使用した細胞増殖バイオアセイによって確認した。このアッセイでは、形質導入した線維芽細胞およびコントロールの未変換の線維芽細胞からの上清を、IL-2依存性T細胞系CTLL-1と共にインキュベートした。細胞増殖およびIL-2活性の指標として³H-チミジンの取り込みを測定した(図3)。

B. 動物腫瘍モデルにおける形質導入した線維芽細胞の効力

IL-1を分泌するように遺伝学的に変換した線維芽細胞の効力を結腸癌の動物モデルでテストした。これらの研究において、Balb/c CT26腫瘍細胞系を、形質導入してIL-2を発現するBalb/c線維芽細胞とともに皮下注射した。コントロール群は、1) CT26腫瘍細胞および未変換線維芽細胞の混合物; 2) 線維芽細胞を含まないCT26腫瘍細胞; および3) 形質導入された線維芽細胞単独を注射した動物を含むした。形質導入線維芽細胞およびCT26細胞で処理した動物の8分の3で腫瘍が検出されなかった。これとは対照的に、CT26腫瘍細胞を注射された全てのコントロール動物(8/8)は、触診でわかるほどの腫瘍を発達させた。CT26腫瘍細胞を含まない形質導入線維芽細胞を接種した動物では、腫瘍は検出されなかった。IL-2分泌線維芽細胞を注射したBalb/cマウスにおける平均CT26腫瘍サイズは、コントロール群と比べてかなり小さかった(図4)。

多変量非母数統計手法(Kaziolら、Biometrics 37:383-390,1981およびKaziolら、Computer Prog.Biochem.19:69-74,1984、これらは本明細書中に参考として援用されている)を利用して、処理群中の腫瘍増殖の違いを評価した。図4に示す4つの処理群に対する腫瘍増殖曲線は、有意に異なっていた($p=0.048$)。統いて行った処理群間の比較は、腫瘍の増殖においてCT26腫瘍細胞だけを注射した動物と 2×10^6 個の形質導入線維芽細胞およびCT26腫瘍細胞で処理した動物との間に有意な相違($p < 0.05$)を示した(図4)。

実施例III

A. 計画の概要

癌のリンホカイン遺伝子治療は、通常の治療に失敗した患者において評価される。ネオマイシンホスホトランスクレオチド遺伝子を含有するN2由来レトロウイルスベクターを用いる。このベクターは、最近のヒト被験者を用いた定評ある研究を含むインビトロおよびインビブでの研究について、多くの研究者によって使用してきた(Rosenbergら、N.Cancer J.Med.,323:570-578,1990)。本研究で用いられるリンホカインベクターは、Millerらによって開発され記載されている、N2由来ベクター、LXSNから生成される(Millerら、Mol.Cell Biol.1:6:2895,1986およびMillerら、BioTechniques 7:180,1989)これらの文献は本明細書中に参考として援用されている。ベクター-LXSN-RI-IL2は、レトロウイルス5'LTRプロモーターの

制御下でヒトIL-2 cDNAを、そしてSV40プロモーター制御下でネオマイシンホスホトランスクレオチド遺伝子を含有する(図1を参照のこと)。正常のヒトIL-1リーダー配列を、ラットオインスリンおよびヒトIL-2リーダー配列を含有するキメラ配列で置き換えた(表2、3、および4を参照のこと)。このキメラリーダー配列は、IL-2遺伝子の発現を高める。

LXSN-RI-IL2ベクターを構築するために、完全長IL-2 cDNAおよびキメラリーダー配列を含有する細胞プラスミドpBC12/CMV/IL2(Cullen,B.R.,DNA 7:645-650,1988、本明細書中に参考として援用されている)を、HindIIIで切断し、そして末端をKlenowポリメラーゼを用いて平滑化した。IL-2 cDNAを、統いてHindIIIを用いた切断によりプラスミドから切り離した。IL-2フрагментを、1%アガロースゲル中で電気泳動により精製し、そして適切なバンドを、ガラスパウダー法を利用して抽出した。簡単にはゲルスライスを65°で4M NaClに溶解した。室温にまで冷却した後、4μlの酸化シリカ溶液(BIO-101,La Jolla,CA)を添加して、DNAを吸着した。次いで、シリカを、TE緩衝液中で0.1M NaClを含有する80%エタノールの冷溶液で洗浄した。DNAを、蒸留水中で55°で加熱することによりシリカから溶出した。次いで、精製IL-2 cDNAを、pLXSNベクターのHind-I-Hind-Iクローニング部位に順方向に連結した。pLXSN-RI-IL2ベクターおよびその部分的ヌクレオチド配列のより完全な記載を、表2、3、4、5、および6に示す。

表2

表3

1位から6385位までのLISH-R1-IL2の記載

塩基	記載
1-581	モロニーマウス肉腫ウイルス5'LTR
659-1458	延長したパッケージングシグナルの配列
1469-2151	+メラリーダー配列を有するIL-2 cDNA
1469-1718	IL-2+メラリーダー配列
1647-1718	シグナルペプチドのコード領域
1719-2151	成熟IL-2コード配列
2158-2159	Mo Mu肉腫ウイルス末端/SV40開始
2159-2503	サルウイルス40初期プロモーター
2521-2522	サルウイルスDNA末端/Ts5 DNA開始
2557-3551	ネオマイシンカスホトランスクエラーゼ
2570-3371	Ts5 DNA末端/モロニーマウス白血病ウイルス開始
3411-4004	モロニーマウス白血病ウイルス3'LTR
4073-4074	モロニーマウス白血病DNA末端/pBR322 DNA開始
4074-6365	プラスミド骨格

(以下余白)

酵素(1位開始)

位置
AatI [2] 1961, 2481
Aat2 [2] 811, 6295
AccI [1] 4252
Acc2 [19] 392, 394, 445, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3084, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 6263
AcyI [5] 808, 2685, 3860, 5910, 6292
AflI [13] 260, 273, 328, 526, 756, 1277, 3201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733
AflII [4] 34, 1064, 1955, 3446
AclI [2] 1592, 4480
Ahal [20] 161, 237, 473, 474, 602, 644, 789, 2689, 2849, 3578, 3853, 3888, 4017, 4059, 4126, 4161, 4860, 5556, 5907
Aha2 [5] 808, 2685, 3860, 5910, 6292
Aha3 [3] 5239, 5258, 5950
AluI [33] 29, 33, 119, 190, 411, 654, 734, 742, 1470, 1486, 1751, 1933, 2003, 2446, 2500, 2791, 3249, 3441, 3445, 3532, 3607, 3826, 4069, 4122, 4141, 4422, 4648, 4738, 4784, 5041, 5562, 5662, 5725
AlwI [20] 1110, 1414, 1665, 2018, 2147, 2150, 2529, 2553, 2864, 2929, 3110, 4027, 5041, 5129, 5225, 5226, 5689, 6006, 6010
AlwN1 [4] 231, 3572, 3847, 4896
AocI [2] 847, 1076
Aoc2 [19] 323, 413, 426, 597, 1583, 1721, 2631, 2724, 2798, 3988, 3950, 3739, 3828, 3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044
AosI [2] 2787, 5955
ApalI [4] 1717, 4295, 4794, 6040

ApyI [22] 315, 623, 801, 814, 1227, 1252, 1275, 1295, 1325, 1526, 1536, 1558, 1630, 2196, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508, 4629, 4642
Aqul [6] 241, 472, 1998, 3821, 3854, 3887
AsaI [2] 1801, 5545
Asp700 [1] 5972
Asp71B [2] 476, 3891
AspA1 [1] 1145
AsuI [29] 169, 200, 245, 260, 273, 328, 626, 756, 826, 839, 1043, 1254, 1277, 1532, 1649, 2101, 3541, 3816, 3616, 3661, 3678, 3689, 3744, 4041, 5415, 5494, 5511, 5733, 6349
AvaI [6] 241, 472, 1998, 3821, 3854, 3887
Ava2 [13] 260, 273, 328, 626, 756, 1277, 3201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733
Ava3 [2] 2232, 2304
Avr2 [2] 1962, 2482
BaiI [3] 658, 1169, 2767
BamH1 [1] 2152
BanI [9] 318, 476, 1200, 2684, 2719, 3734, 3859, 1891, 5321
Ban2 [8] 413, 426, 597, 1583, 3050, 3828, 3841, 4012
Bbel [2] 2688, 3863
BbvI [22] 959, 997, 1738, 2493, 2632, 2758, 2800, 2816, 2909, 3321, 4060, 4131, 4228, 4372, 4390, 4809, 4899, 4902, 5108, 5411, 5600, 5802
BclI [1] 2526
BglI [2] 2435, 5493
Bsp1286I [19] 323, 413, 426, 597, 1583, 1721, 2631, 2724, 2798, 2988, 3050, 3739, 3828, 3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044

BspB1 [3] 5200, 6208, 6313
BspM1 [4] 1501, 2500, 2572, 2953
BspB2 [4] 392, 443, 3082, 3807
BstE2 [1] 1145
BstN1 [22] 315, 623, 801, 814, 1227, 1252, 1275, 1295, 1325, 1526, 1536, 1558, 1630, 2196, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508, 4629, 4642
BstN1I [19] 392, 394, 445, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3084, 3809, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 6263
BstX1 [1] 2060
BstY1 [11] 2010, 2152, 2821, 2856, 3102, 5121, 5132, 5218, 5230, 5998, 6015
Bsu36I [2] 847, 1076
Ccr1 [1] 1998
Cfr1 [31] 394, 396, 445, 447, 714, 971, 2679, 2687, 2751, 2788, 3054, 3084, 3086, 3314, 3805, 3811, 3852, 4083, 4186, 4216, 4357, 4390, 4660, 4727, 4827, 5001, 5110, 5503, 5596, 5598, 6265
Cfr1I [9] 656, 790, 1167, 1188, 2391, 2765, 3156, 3183, 5761
Cfr1OI [31] 3004, 3185, 5453
Cfr1XI [29] 169, 200, 245, 260, 273, 328, 626, 756, 826, 839, 1043, 1254, 1277, 1532, 1649, 3201, 3541, 3586, 3616, 3661, 3676, 3689, 3744, 4041, 5415, 5494, 5511, 5733, 6349
Cfr1LI [2] 847, 1076
DdeI [23] 75, 165, 191, 282, 553, 847, 1076, 1348, 1692, 2442, 3348, 3487, 3582, 3657, 3698, 3879, 3967, 4290, 4755, 5164, 5330, 5870, 6296
DpnI [30] 95, 1104, 1236, 1421, 1659, 2012, 2154, 2523, 2528, 2847, 2858, 2936, 3017, 3026, 3104, 3507, 4021, 5048, 5123, 5134, 5142, 5220, 5232, 5337, 5678, 5696, 5742, 6000, 6017, 6053

特表平7-503455 (11)

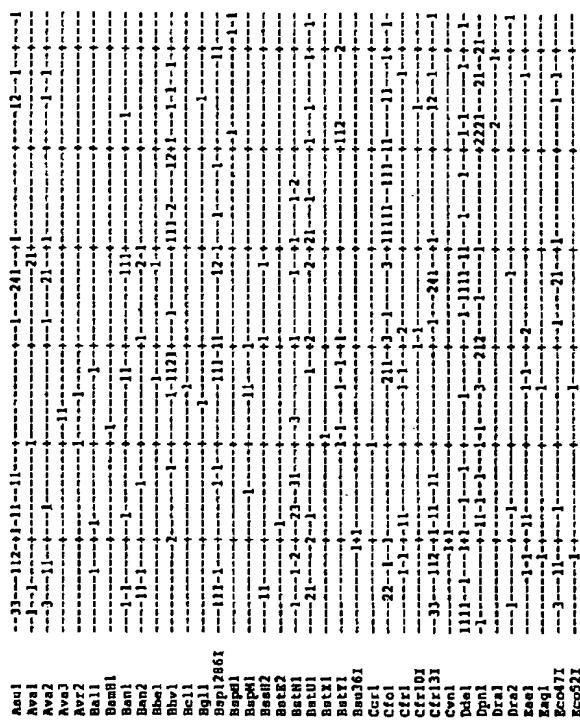
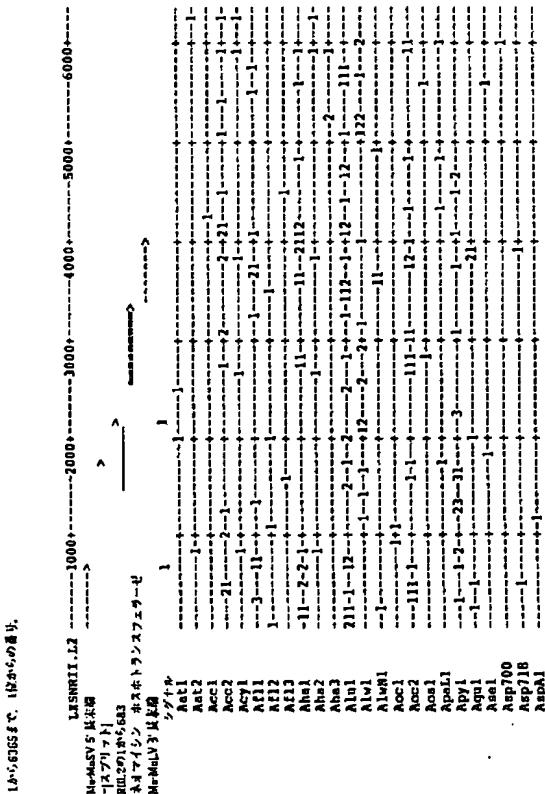
DraI	{ 3}	5239, 5258, 5950	HaeJ	[35]	171, 202, 247, 658, 792, 828,
Dra2	{ 4}	328, 1277, 3744, 6349		840, 1045, 1169, 1190, 1255, 1534, 1650,	
EcoI	{ 9}	656, 790, 1167, 1188, 1591, 2765,		1866, 1961, 2423, 2429, 2438, 2481, 2593,	
	3156, 3183, 5761		2767, 3158, 3185, 3543, 3588, 3618, 3663,		
EagI	{ 2}	790, 2591		4493, 4506, 4524, 4958, 5416, 5496, 5763,	
Eco47I	{ 13}	260, 273, 328, 626, 756, 1277,		6350	
	3201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733	Hap2	[30]	161, 237, 473, 601, 643, 789,	
Eco52I	{ 2}	790, 2591		2390, 2667, 2689, 2717, 2848, 2938, 3005,	
Eco8II	{ 2}	847, 1076		3186, 3578, 3653, 3888, 4016, 4058, 4126,	
EcoN1	{ 2}	850, 1450		4180, 4687, 4834, 4880, 5050, 5454, 5468,	
EcoO109I	{ 4}	328, 1277, 3744, 6349		5555, 5665, 5907	
EcoR1	{ 1}	1660	Hgal	{ 8}	458, 707, 960, 1580, 4175, 4591,
EcoR1*	{ 14}	938, 1037, 1460, 1798, 1805, 1928,		5169, 5899	
	2064, 2121, 2236, 2308, 2400, 5240, 5546,	EgiA1	{ 9}	413, 1721, 2798, 2988, 3828, 4300,	
	5801		4798, 5959, 6044		
EcoR2	{ 22}	313, 621, 799, 812, 1225, 1250,	Hhal	{ 31}	394, 396, 445, 447, 714, 971,
	1273, 1293, 1323, 1524, 1534, 1558, 1628,		2679, 2687, 2751, 2788, 3054, 3084, 3086,		
	2194, 2249, 2266, 3070, 3729, 4036, 4506,		3314, 3809, 3811, 3862, 4083, 4186, 4216,		
	4627, 4640		4357, 4390, 4660, 4727, 4827, 5001, 5110,		
EcoR5	{ 4}	137, 213, 3554, 3629	HinP1	{ 31}	392, 394, 445, 448, 712, 969,
EcoT22I	{ 2}	2232, 2304		2685, 2749, 2786, 3052, 3082, 3084,	
Fdi2	{ 2}	2787, 5595		3312, 3807, 3809, 3860, 4081, 4184, 4214,	
Fnu48I	{ 41}	793, 967, 983, 985, 1191, 1752,		4359, 4388, 4658, 4725, 4825, 4999, 5108,	
	2430, 2507, 2594, 2646, 2657, 2747, 2752,		5301, 5394, 5931, 6263		
	2789, 2830, 2917, 2920, 2925, 3050, 3255,	Hinc2	{ 1}	5914	
	3296, 3310, 4074, 4120, 4217, 4270, 4386,	Bind2	{ 1}	5914	
	4404, 4407, 4525, 4680, 4682, 4808, 4891,	Bind3	{ 1}	2498	
	5097, 5425, 5614, 5764, 5791, 5886, 6115	Hinf1	{ 14}	298, 517, 857, 868, 1553, 1814,	
FnuD2	{ 191}	192, 394, 445, 969, 971, 1193,		3170, 3304, 3356, 3881, 4380, 4435, 4851,	
	2751, 3052, 3084, 3807, 3809, 4081, 4083,		5368		
	4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 6263	Hpa2	{ 30}	161, 237, 473, 601, 643, 789,	
Fok1	{ 131}	498, 1198, 1358, 1679, 2331, 2552,		2890, 2867, 2869, 2917, 2938, 3005,	
	3009, 3034, 3912, 4168, 5339, 5520, 5807		3186, 3578, 3653, 3888, 4016, 4058, 4126,		
Fsp1	{ 2}	2787, 5595		4160, 4687, 4834, 4860, 5050, 5454, 5468,	
Hae2	{ 4}	2688, 3863, 4358, 4728		5555, 5665, 5907	
		Hph1	{ 11}	1214, 1240, 1817, 2863, 4102, 4111,	
		Kpn1	{ 2}	480, 3895	
		Hae1	{ 15}	30, 293, 689, 717, 739, 1452,	
			1606, 1693, 1963, 2483, 3442, 3709, 4975,		
			5228, 5563		

Mae2	{ 11}	808, 1139, 1180, 1987, 2801, 2988,	Hdel	{ 1}	4303
	4233, 5183, 5599, 5972, 6292	Hde2	{ 30}	93, 1102, 1234, 1419, 1657, 2010,	
MaeJ	{ 20}	38, 1032, 1080, 1145, 1289, 1478,		2152, 2521, 2526, 2545, 2856, 2934, 3015,	
	1706, 2805, 3111, 3450, 4134, 4229, 4836,		3024, 3102, 3505, 4019, 5046, 5121, 5132,		
	4899, 5015, 5298, 5629, 5687, 5840, 6016		5140, 5218, 5230, 5335, 5676, 5694, 5740,		
Mbo1	{ 30}	93, 1102, 1234, 1419, 1657, 2010,		5998, 6015, 6051	
	2152, 2521, 2545, 2856, 2934, 3015,	Hhel	{ 3}	29, 1605, 3441	
	3024, 3102, 3505, 4019, 5046, 5121, 5132,	Hla3	{ 26}	61, 1263, 1596, 1649, 1835, 1856,	
	5140, 5218, 5230, 5335, 5676, 5694, 5740,		2030, 2230, 2302, 2393, 2559, 2904, 3090,		
	5998, 6015, 6051		3121, 3147, 3473, 4119, 4224, 4484, 5204,		
Mbo2	{ 17}	444, 1145, 1356, 1575, 1617, 1908,		5695, 5705, 5783, 5819, 6212, 6317	
	1911, 3046, 3256, 3336, 4351, 5142, 5213,	Nla4	{ 28}	153, 246, 262, 320, 478, 627,	
	5968, 6046, 6155, 6351		758, 827, 959, 1202, 1279, 2154, 2200,		
Mnl1	{ 54}	291, 444, 508, 534, 560, 639,		2272, 2686, 2721, 3678, 3736, 3861, 3893,	
	841, 939, 1227, 1330, 1363, 1369, 1372,		4042, 4512, 4551, 5323, 5417, 5458, 5669,		
	1378, 1408, 1411, 1426, 1433, 1449, 1559,	Nell	{ 2}	2232, 2304	
	1620, 1909, 1921, 2412, 2418, 2443, 2449,	Nsp(7524)1	{ 8}	1596, 1835, 1856, 2230, 2302, 3090,	
	2455, 2458, 2470, 2508, 2535, 2599, 2735,		4119, 4484		
	3092, 3286, 3707, 3859, 3878, 3923, 3948,	Nsp(7524)2	{ 191}	323, 413, 426, 597, 1583, 1721,	
	3974, 4054, 4087, 4117, 4379, 4587, 4662,		2631, 2724, 2798, 2988, 3050, 3739, 3828,		
	4911, 5311, 5392, 5540, 5746, 6339		3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044		
Mse1	{ 22}	35, 1065, 1177, 1207, 1231, 1801,	NspB2	{ 12}	119, 190, 1751, 2158, 2791, 3532,
	1843, 1956, 1971, 2124, 2139, 3447, 4261,		3607, 3899, 4192, 4822, 5067, 6008		
	5186, 5238, 5243, 5257, 5310, 5845, 5884,	NspH1	{ 8}	1596, 1835, 1856, 2230, 2302, 3090,	
	5949, 6321		4119, 4484		
Msp1	{ 30}	161, 237, 473, 601, 643, 789,	PmeR7I	{ 1}	1998
	2590, 2667, 2689, 2717, 2848, 2938, 3005,	Pml1	{ 35}	171, 202, 247, 658, 792, 828,	
	3186, 3378, 3653, 3888, 4016, 4038, 4126,		840, 1045, 1169, 1190, 1255, 1534, 1650,		
	4160, 4687, 4834, 4860, 5050, 5454, 5488,		1866, 1961, 2423, 2429, 2438, 2481, 2593,		
	5355, 5665, 5907		2767, 3158, 3185, 3543, 3588, 3618, 3663,		
Mst1	{ 2}	2787, 5595		4493, 4506, 4524, 4958, 5416, 5496, 5763,	
Mst2	{ 2}	847, 1076		6350	
Mva1	{ 22}	315, 623, 801, 814, 1227, 1252,	Ple1	{ 7}	865, 1547, 3350, 3889, 4374, 4859,
	1275, 1295, 1325, 1526, 1536, 1558, 1630,		5362		
	2196, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508,	PpuM1	{ 3}	328, 1277, 3744	
	4629, 4642				
Mae1	{ 1}	3187	Pss1	{ 4}	331, 1280, 3747, 6352
Mar1	{ 2}	2685, 3860	Pst1	{ 6}	987, 1183, 1888, 2311, 2738, 5618
Mcil	{ 20}	161, 237, 473, 474, 602, 644,	Pvu1	{ 1}	5743
	789, 2689, 2849, 3578, 3653, 3888, 3899,				
	4017, 4059, 4126, 4161, 4860, 5556, 5907				
Mco1	{ 2}	2389, 3117			

特表平7-503455 (12)

Pvu2	{ 6}	119, 190, 1751, 2791, 3532, 3607	Sap1	{ 1}	6177
RsaI	[10]	347, 476, 725, 1342, 1519, 1597, 2991, 3893, 4288, 5853	Sst1	{ 2}	413, 3828
Rsr2	{ 11}	3201	Sst1	{ 2}	1961, 2481
SacI	{ 21}	413, 3828	Sty1	{ 91}	324, 536, 1303, 1962, 2389, 2482, 3117, 3740, 3950
Sau3AI	{ 30}	93, 1102, 1224, 1419, 1657, 2010, 2152, 2521, 2526, 2545, 2856, 2934, 3015, 3024, 3102, 3305, 4019, 5046, 5121, 5132, 5140, 5218, 5230, 5335, 5676, 5694, 5740, 5998, 6015, 6051	Taq1	{ 15}	660, 1096, 1407, 1418, 1660, 1999, 2514, 2798, 2954, 2978, 3014, 3176, 3367, 4580, 6024
Sau96I	{ 29}	169, 200, 245, 260, 273, 328, 626, 756, 826, 839, 1043, 1254, 1277, 1532, 1649, 3201, 3541, 3586, 3616, 3681, 3676, 3689, 3744, 4041, 5415, 5494, 5511, 5733, 6349	Tha1	{ 19}	392, 394, 445, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3084, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 6263
Scal	{ 1}	5853	Tth111I	{ 6}	465, 877, 1295, 2803, 3880, 4227
SceFI	{ 421}	161, 237, 315, 473, 474, 602, 623, 644, 789, 801, 814, 1227, 1252, 1275, 1299, 1325, 1526, 1536, 1558, 1630, 2196, 2251, 2258, 2689, 2849, 3072, 3578, 3683, 3731, 3888, 4017, 4038, 4059, 4126, 4161, 4508, 4629, 4642, 4860, 5556, 5907	Xba1	{ 2}	1892, 3708
Sdul	{ 19}	323, 413, 426, 597, 1583, 1721, 2631, 2724, 2798, 2988, 3050, 3739, 3828, 3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044	Xba1	{ 1}	1998
Sec1	{ 38}	159, 235, 314, 324, 472, 536, 621, 622, 760, 799, 800, 812, 813, 1225, 1294, 1303, 1323, 1324, 1525, 1557, 1962, 2194, 2266, 2389, 2424, 2433, 2482, 2848, 3117, 3576, 3651, 3730, 3740, 3887, 3950, 4038, 4037, 4640	Xho2	{ 11}	2010, 2152, 2521, 2856, 3102, 5121, 5132, 5218, 5230, 5998, 6015
SfaN1	{ 23}	258, 520, 997, 1657, 2107, 2239, 2311, 2643, 2898, 2984, 3048, 3114, 3323, 3674, 3934, 4146, 4281, 4317, 4357, 4577, 5629, 5820, 6089	Xba1	{ 2}	472, 3887
Sfil	{ 1}	2435	Xba1	{ 2}	790, 2591
SmaI	{ 21}	474, 3889	Xba1	{ 1}	5972
Sph1	{ 1}	726	Xba2	{ 1}	5743
Sphi	{ 4}	1835, 2230, 2302, 3090			

E5



卷之三

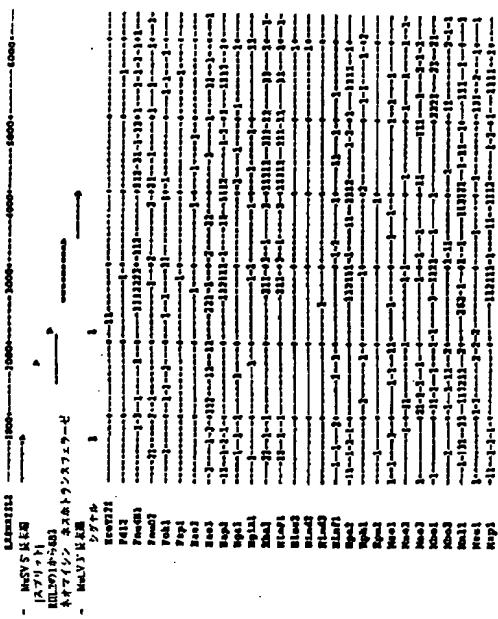
卷之三

114

1

1か月、6365まで。1ヶ月の書り。

卷之三



બ્રહ્મગંડ

卷之三

5 (૫૬)

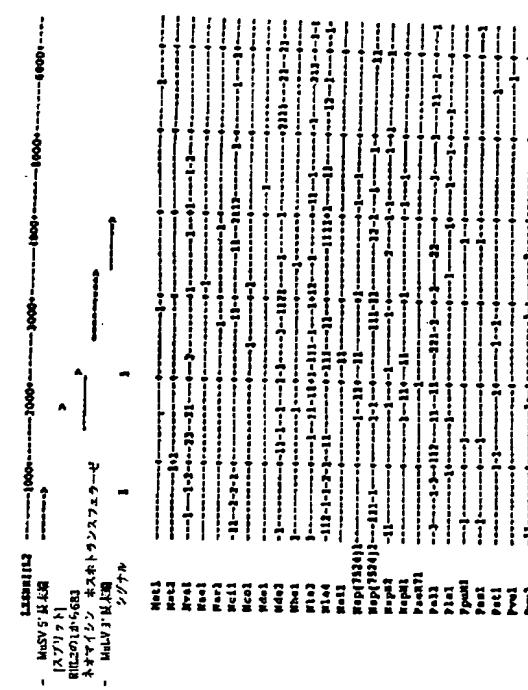
15

AS (M3)

45 (H)

1

100



卷之三

卷之三

卷之三

卷之三

三

十一

ט'ז

111

Detailed description: This is a scatter plot with a regression line. The vertical axis (Y-axis) is labeled 'S' and has major tick marks at 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, and 6000. The horizontal axis (X-axis) is labeled 'A' and has major tick marks at 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, and 13700 ha. A dashed line represents the regression curve. Data points are categorized by symbol: squares for 'MANY SPECIES', triangles for 'MEDIUM SPECIES', and circles for 'FEW SPECIES'. A legend on the left side of the plot area identifies these symbols.

1から6355まで。1位からの書引。

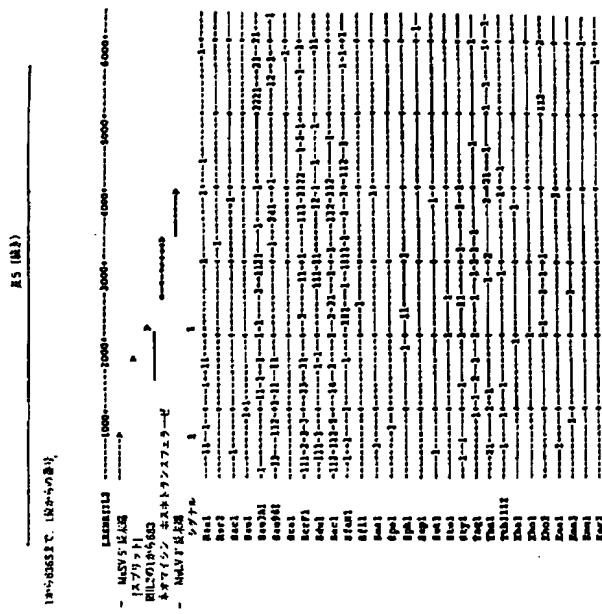
卷之三

卷之三

卷之三

卷 6

1から5までの、1位からの音量



麻子(黑角)

特表平7-503455 (16)

116 (88%)
 DCVAS ||
 DHEG3 Spinal DPM1112
 || 850 650 670 1850 850 700 710
 CCCACACTA CGAACCGAGT GATTTGGCA TGCCTGGGTC TGCGGATGATG TGGCTTGCTG AGCGGACGAA
 CGGGCAACT CCGTCCGCA CCTACACCTT AGCGCTGGGGG ATGCCATGATC ACCAGGAGCA TCCCTGTCTG

>KepII >CcrI
>EcoI >EanI

	$\Delta \text{H}_{\text{m}}^{\circ}$	$\Delta S_{\text{m}}^{\circ}$	$\Delta F_{\text{m}}^{\circ}$	$\Delta G_{\text{m}}^{\circ}$	$\Delta C_{\text{p}}^{\circ}$
II-30	1140	1150	1150	1170	1180
III-30	1140	1150	1150	1170	1180
IV-30	1140	1150	1150	1170	1180
V-30	1140	1150	1150	1170	1180
VI-30	1140	1150	1150	1170	1180
CECTATGTC AAAAGACAGC TGGTGCGT CCTTGTGCGA GCAAGATGCG CAACGTTTA CTGGCGATG CCCATGTC TTCTTGCGA CAAGCAGC AGCAGCAAGC GCTCTTACGG ATGGAAATT CGACGCGATG					

>Res1
 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
 CACGGCCCTT TACAGCTTA AGCGTCGCGC TGTTGTTGCTT CCACTTGCTT GGTTCATGCTT CTTTGAACTT
 CCTGGCGAA CATGTTGAT TCGGGCGGC AGAGAGACCA GGTAAAGGGGG CGAACAGGGG CGAACATGGG

The diagram illustrates the PspB1-PspB2 operon. It features two transcription start sites, σ_{PspB1} and σ_{PspB2} , indicated by arrows pointing away from the genes. The $PspB1$ gene is located upstream of $PspB2$. The $PspB1$ promoter region contains the sequence **TTCATGCGA**. The $PspB2$ promoter region contains the sequence **GGCTCACTG**. The $PspB1$ gene encodes a protein of 200 amino acids, while $PspB2$ encodes a protein of 199 amino acids.

The diagram illustrates the gene structure of PspA1. It features two promoters: PspA1 (top) and PspB1 (bottom). The PspA1 promoter includes a -35 box at position 1830 and a -10 box at position 1850. The PspB1 promoter includes a -35 box at position 1860 and a -10 box at position 1870. Transcription start sites are indicated by arrows pointing away from the promoters. The sequence of the gene is shown below the promoters.

表6 (续)

BACTERIAL VIRENSES		VIRAL VIRENSES		PARASITIC VIRENSES		FUNGAL VIRENSES		MISCELLANEOUS	
Pavv2	-	-	-	Nasal	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	Throat	-	-	-	-
PSty1	-	-	-	-	-	Scalp	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dura	-	SPHERATI	-	SPHER	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prax1	-	SPHER1	-	SPHER1	-	SPHER1	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060
VV	VV	VV	VV	VV	VV	VV	VV	VV	VV
GGCTTACGCC	TTATCAGGA	ATTAACGCT	AAATCTTC	CCCTTAAGG	GGCTTAAAC	AACTTCCC	TTTCTTCA	TTTCTTCA	TTTCTTCA

38813
 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TGTGAAATG CGCATGAC AGGCCCGTC GTGGATTTTG TTAACGAGT CATTACCTTT TGTGAAACA

> BamHI
 -
 PstI
 -
 > EcoRI KpnI
 > SphI SacI 40_48_K 70A-7-
 MspI-HaeIV_SacI_40_48_K 70A-7-
 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170
 TGCATCTTCAAC ACTAACTGTTA TAATTAATG CTTCGCAACT AAACATATC AGGAGCGGT GCGGAATGTT
 AGTACGCTT TGTACGACT ATTAACTG CACGGCTGA TTTCGATGCA TCCGGCGA CACCTTACG

200722
-
2021.1

特表平7-503455 (17)

特表平7-503455 (18)

```

>Pf161
      Pfn5_DNA_#12/_Ra-MuLV_DNA_R1W

  3380      3360      3370      3380      3390      3400      3410      3420
TTC TCA GCGGATTC TGGGGCTTA TAATAATAAA CTTTTTATTG AGCTTCAGA AAAAAGGGGGG ATGGAAAGG
AGG ACT GCGGTGAAAC ACGCCGAGGT ATTTTATTTT CTAAATTTAA TGAGGCGTT TTTCGCGGGG TTAGTTCTG
Pfn EMD

```

Rat GATA-3 3' UTR
Rat GATA-4 5' UTR

186 (88.8) >Rsp62
 DALWII Dpm62
 3530 | 2980 2990 3600 3610 3620 Erc61
 3530 2980 2990 3600 3610 3620
 GGGAAACGAT TCTTCGCGG CCTGAGGAGGAGGAGGACGAT GCGAACGAGGCGT AATATGGCCG AAAACGAGTA
 CCTGGCTCA AGAGGAGGCGG GAGGAGGAGG GCTTGTTGCGA CCTTGTGCGG TTATACCGGG TTTCGCTCAT

The diagram illustrates the S1 nuclease protection assay setup. The top sequence shows the genomic DNA with restriction enzyme sites KpnI at positions 3640, 3650, 3660, 3670, 3680, 3690, and 3708. Below the sequence, a probe (P) is indicated with arrows pointing to the protected regions. Four protected RNA fragments are labeled: >Pex1, >Pex2, >Ecm101, and >Ppme1. The Ppme1 fragment is shown as a double-headed arrow between positions 3730 and 3770. The Pex1, Pex2, and Ecm101 fragments overlap, starting around position 3730 and ending around position 3760. The bottom part of the diagram shows the protected RNA fragments with their respective start and end positions: Pex1 (3730-3760), Pex2 (3730-3760), Ecm101 (3730-3760), and Ppme1 (3730-3770).

D89827 D89828
 1990 4000 4010 4020 4030 4030 4040 4050
 ACCGTTTACG CATTGGTCGGG CTGTCTGGG ATGCCGAGG GCGCTTCCG CGCCATCA
 TGGCCGAA CCTCCACAAA GTAAACCCCGG GAGCAGGGCC TGGCTCTTG GCGACGCGC CTCUGTGCT

圖 6 (總合)

```

>RspT52418
>RspP51
>RspT52
4450   4490   4500   4510   4520   4530   4540
CAAGGCTT CATTGACCA AACGGCGAG AAAACCGAC GACCCGATA AACGGCGGT
TCATTTCTT TGTACAGTG TTGGCGGAA TTTGGCGGTT CTGGCGGTT AACGGCGAA

```

特表平7-503455 (18)

R6 (R8)

TTTCATAGGCTTGGGGGGG CTCATGAGGCA TCAACAAATG CGAACGCTCA AGTCAGGTGCGG
AAGGATGATC GCGGGGGGGG GACTCTGCTT AGCTTCTTCTT GCTTGGGGGGG GCGGGGGGGG

4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680
ACAGGACTAT AACATACCA CGGTTTGGG ECTGGAAAGCT CGGTGGGGGGG GCTGGGGGGG
GCTGGGGGGG GAGGATGATC GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750
GGCTTACGG AGATGCTGG CGGTTTGGG GCTGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820
GATGTCAGT TGGCTTGGG TGGTGGG CGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
CATAGAGTGG AGGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890
GCTGGGGGGG GAGGATGATC GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960
GAGGACTGG TACGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030
TAACCTGGGG TACACTGAA CGGGGGGGG TGGTGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
ATTCATGGGG ATGGTGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

>R982

R6 (R8)

5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100
AGCTTGCTGA CCTCTGCTGC CGAACGCTCA AGTCAGGTGCGG
GCTGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170
AGATTACGG AGGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCTGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240
GAGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310
AGTTTAAA GAGGTTTAA AGCTTCTA AGTATGTTG AGTACGGT GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCTGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380
TAATGCTGAG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
ATTAGTACG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520
TCACGGGG GAGGTTTAA AGCTTCTA AGTATGTTG AGTACGGT GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCTGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590
TCACGGGG GAGGTTTAA AGCTTCTA AGTATGTTG AGTACGGT GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCTGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660
GCTGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730
ACGTCGGGG CCTGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG
GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG GCGGGGGGGG

特表平7-503455 (20)

表6 (継合)

GTATCTCAT ATGTTTCTT TTGGATATAA ATTCAACCAT TTATCAGGTT TATTTGTTCA TGACCGGATA
CTTATGACTA TCGAGGAA AACATTATAA TACGTTGTTA AAATGCTCAA ATAGTCCTCA ATACGCGTAT ACTCCGCTAT

6240 6240 6250 6260 6270 6280 6290
GATATTCGA TCATTTAGA AACATTAAAC AATAGGGTT CCCCCACAT TTGGCGGAA ACTCCGCTAT
CTTATGACTA AGATTAACI TTATTTGTT TATTCGGCAA GCGCGTTAA AGGGCGTTT TCGACGTTA

>Pst1
>Alu1
>Avy1
>Nco1
>Bpu1
>Pst1
>Eco1
>Pst1
6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260
GAGCTCTAG AACATTAT TATCATGACA TTACGATA AAAATAAGG TATCGAGG CCTTTTGT
CTGCACATTC TTGGTATAA ATAGACTAT AACCGATAT TTTTATCGG ATAGTGTTG CGCGAAGGAG

TCGA
AGGT

LXSN-IL2を切断しない酵素:

酵素	Sph1	Cla1	Bpu1	Pst1	Eco1	Nco1
Alu1	Xba1	Bpu1	Xba1	Pst1	Bpu1	Xba1
Nco1	Xba1	Bpu1	Xba1	Pst1	Bpu1	Xba1
Bpu1	Xba1	Bpu1	Xba1	Pst1	Bpu1	Xba1

LXSN-IL2-レトロウイルスベクターを生成するためには、10マイクログラムのpLXSN-RI-IL2 DNAを、標準的なリン酸カルシウム沈殿法(Millerら、Mol.Cell Biol.6:2895,1986)によって外性の(ecotropic)パッケージング細胞系PE301にトランスフェクトした。トランスフェクトしたPE301細胞系を、10%FCSを含むDMEM培地で増殖した。培地を24時間後に交換し、そして24時間後に上清を採取し、上記のように両性の(imp hotropic)パッケージング細胞系PAS17に感染させた(Millerら、Mol.Cell Biol.6:2895,1986およびMillerら、BioTechniques 7:980,1989)。感染PAS17細胞を、トリプシン処理24時間後に採取し、そして10%FCSおよびキオマイシン類似体G418(400μg/ml)を含有するDMEM中に1:20で再ブレートした。細胞を、1500rpm回転下、37°Cで増殖した。コロニーが現れるまで選択培地を5日毎に交換した。14日目に、20コロニーを選択し、展開し、そして標準的方法(Xuら、Virology 171:331-341,1989)によってウイルス産生物をテストした。簡単に言えば、上清を、無密(confluent)培養皿から採取し、0.45μmのフィルターを通し、10%FCSを含むDMEMで希釈し、そして4μg/mlのポリブレン存在下でNIH 3T3を感染させるのに利用した。24時間後、キオマイシン類似体G418を含有する培養培地で感染NIH 3T3細胞を増殖した。12~14日後、コロニーを染色して計数し、そしてウイルス力値を上記のようにして計算した(Xuら、Virology 171:331-341,1989)。

ノーマンプロット分析によって、IL-2発現について、最も高

いウイルス力値を有するコロニー(>10⁴感染単位/ml)をテストした。最も高いウイルス力値を有するコロニーおよび上記のIL-2発現物を凍結保存した。そして、これらをLXSN-RI-IL2-レトロウイルスベクター試験を行うためのストック培養物として利用する。

実験例11

レトロウイルスベクターの構築およびサイトカインの発現

形質導入した細胞系によるIL-2の生産を増加させるために、IL-2発現を進める異なるプロモーターを含有するベクターを用い、そしてヒトIL-2 cDNAを、インスリン分泌シグナルペプチド中に順方向にサブクローンした(17)。IL-2 cDNAを、LXSN(LTRプロモーター)およびLNCK(CMVプロモーター)ベクター(Dr. A. D. Millerより贈呈)の親プラスミド中に順方向にサブクローンした(18)。LXSN-IL2およびLNCK-IL2と命名した新たに構築したベクター(図1)を、レトロウイルスの上清の生産のためにPAS17細胞系にパッケージした。コントロールとして、高レベルの発現をする2重コピーベクターDC/TKIL-2ベクター(チミジンキナーゼプロモーター)(Dr. E. Gilboaより贈呈)を比較に用いた。

これらのベクターを、多くのマウス、ヒト、初代および樹立細胞系に用いた。形質導入した細胞のブールを選択し、そして10%ケン胎児血清(FBS)およびキオマイシン類似体である活性G-418(400μg/ml)を含有するDMEM培地に展開した。MCR8およびBalb/c 3T3細胞系における発現の研究の結果を表7に

示す。

表7

異なるIL-2ベクターで形質導入した線維芽細胞によるIL-2発現の比較。

線維芽細胞	ベクター	IL-2の単位	
		ng IL-2 /10 ⁶ 細胞/日	IL-2の単位
マウス	LNCX(コントロール)	0.4 ± 50%	<1
	LNCK-IL2	33.7 ± 11%	67
	LXSN-IL2	6.6 ± 6%	13
	DC/TKIL-2	1.9 ± 5%	4
ヒト	LXSN(コントロール)	0.7 ± 29%	1
	LNCK-IL2	159.5 ± 17%	319
	LXSN-IL2	25.5 ± 15%	51
	DC/TKIL-2	3.0 ± 10%	6

(以下略)

表施例1

LXSN-IL2で形質導入した樹枝芽細胞によるIL-2の発現。

初代線維芽細胞レトロウイルス形質導入体の培養条件を最適化した。初代線維芽細胞を首尾よく培養した。最適条件は、約4~6週間で、 12cm^2 の皮膚生検からの約 $1 \sim 4 \times 10^6$ 個の初代線維芽細胞の増殖を可能にする。遺伝的に改変した線維芽細胞のレトロウイルス感染、G418選択、および展開は、さらに4~6週間かかる。

初代線維芽細胞の遺伝的改変の条件の探索は、最適な形質導入が以下の手順で得られることを示唆する：線維芽細胞を、血清飢餓により、続いて、形質導入の18時間前に1%のウシ胎児血清を含有する培地を用いて刺激することにより、G1期に同期化する。次に細胞を、2サイクルのレトロウイルス感染させ、各サイクルを約3時間続けた。細胞を新鮮な培地で1晩再培養し、次いで翌日、G418中で選択を開始する。本方法は、感染多量度に依存して、培養物中の5~15%の線維芽細胞を形質導入し得る。

本手法を用いて、多くの初代および樹立線維芽細胞を形質導入した。例として、表8ではLXSN-IL2を用いて形質導入した線維芽細胞系におけるIL-1の発現レベルを比較する。

(以下余白)

表8

LXSN-IL2で形質導入した線維芽細胞によるIL-2の発現。

線維芽細胞系	種	起源	ng IL-2 IL-2の単位	
			/10 ⁶ 細胞/日	
Balb/c 3T3	マウス	形質転換体	6.6 ± 6%	13
MCR9	ヒト	胚	25.5 ± 15%	51
NHDY 313	ヒト	皮膚	25.0 ± 10%	50
GT1	ヒト	皮膚	15.0 ± 5%	30

これらの結果は、樹立、胚、および初代線維芽細胞培養におけるIL-2の発現レベルが類似していることを示している。表7でのこれらのデータの比較は、IL-1の発現が、使用した線維芽細胞系よりも、異なるプロモーターのような要因によって、より影響されることを示唆している。同様に、培養条件の変化は、IL-2の発現に重要な影響を及ぼし得る。表8は、形質導入したGT1細胞、すなわち初代ヒト線維芽細胞培養が、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ G418選択下よりも、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ G418選択下での方が15倍多くのIL-1を発現したことを示している。いくつかの他の初代線維芽細胞系もまた、本発明者らのベクターで形質導入され、そしてG418選択下で現在増殖している。

表9

LXSN-IL2で形質導入したGT1細胞によるIL-2発現におけるG418濃度の効果。

G418の選択用量	分泌IL-2 ng/10 ⁶ 細胞/日*
25 μg/ml	1.0 ± 10%
50 μg/ml	3.0 ± 6%
100 μg/ml	15.0 ± 5%

*G418選択の3週間後。

これは、本発明者らの最小の生産力を有するベクターである、DC/TKIL-2を用いて形質導入したBalb/c 3T3線維芽細胞によるIL-2発現レベルと等しい（表7）。MLC中のIL-1発現レベルは $130\text{pg}/10^6$ 細胞/24時間であった。これはPMA/C1が非特異的な応答を誘起し、一方、MLCが特異的Thの刺激になるからである。MLC刺激集団において、推測した抗原特異的Thの割合を考慮に入れると、刺激T細胞当たりのIL-2発現レベルは、両方法で等しくなる。

表10

異なる細胞によるIL-2分泌レベル。

細胞	分泌IL-2 pg/10 ⁶ 細胞/日
リンパ球	
コントロール（非活性化）	5 ± 5%
PMA + カルシウム イオノホア	2,000 ± 6%
混合リンパ球培養	130 ± 90%
形質導入線維芽細胞	
MCR9-LXSN-IL2	24,000 ± 5%
MCR9-LNCX-IL2	162,000 ± 20%
MCR9-DC/TKIL-2	10,000 ± 6%

表施例2
末梢血液リンパ球および遺伝学的に改変された線維芽細胞によつて説明されるIL-2発現レベルの比較

遺伝学的に改変された線維芽細胞によるIL-1の生産を、インビトロで正常ヒト末梢血液リンパ球(nPBL)の刺激によって達成されたIL-1生産と比較するために、nPBLをFicoll-Paque密度遠心分離によって単離し、同種異系nPBL（混合リンパ球培養、MLC）、または、 17nM のホルゴール 12-ミリストート 12-アセチート(PMA)を加えた、 $2\mu\text{M}$ のカルシウムイオノホア((CII)(A23187)逆離酸)存在下で培養した。表10に示すように、本実験の結果は、PMA/C1刺激正常T細胞集団におけるIL-1発現レベルが $2\text{ng}/10^6$ 細胞/24時間であったことを示している。

特表平7-503455 (22)

実施例7-1

マウス腫瘍モデルにおける線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療

2つの実験のプロトコールを用いて、抗腫瘍免疫による線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療の効能を研究した。第一のプロトコールを、腫瘍移植に対する遺伝学的に改変した線維芽細胞をテストするように設計し、一方、第二のプロトコールを、全身的な抗腫瘍免疫を誘導するように設計した。各実験の結果は、2つの図および1つの表に示す。最初の図では、各処理群に対する腫瘍の増殖速度を、ある時間後での群中の平均腫瘍サイズとして示す。2番目の図では、カプラン-メイヤー(Kaplan-Meier)曲線が、各処理群において個々の動物に対する腫瘍初期の時期を示す。各実験についての動物数、腫瘍のない動物の数および割合、および腫瘍サイズ分布パターンを表に示す。

実施例7-1(1)

腫瘍移植における線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療の効果

5×10^4 個のCT26細胞と 2×10^6 個の異なるレトロウイルスベクターによってIL-2を発現するように遺伝学的に改変された線維芽細胞との混合物を、マウスに皮下注射した。腫瘍細胞のみ、または腫瘍細胞と未改変線維芽細胞との混合物を注射したコントロールのアームでは、33動物のうち31動物(94%)で

4週目までに腫瘍が発達した(図6および7、表9)。これとは対照的に、線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療を受けた14動物のうち21動物(65%)が、4週間まで腫瘍がなく、そして1動物(3%)は12週間後も腫瘍がなかった。これらの線維芽細胞媒介IL-2治療を受け、腫瘍が増殖した動物は、腫瘍増殖の開始および速度が遅れる特徴があった。

(以下余白)

腫瘍細胞と改変した線維芽細胞を混合した群	細胞数	腫瘍サイズ (mm)				平均腫瘍サイズ (mm)
		< 10	10-100	101-200	> 201	
マウス	全般	9	1	4	—	42.0
DC/TKIL-2	全般	—	—	5	0	45.4
LNCX-IL2	全般	0	0	3	2	46.8
DC/TKIL-2	腫瘍細胞と改変した線維芽細胞を混合した群	—	—	—	5	72.4
LNCX-IL2	腫瘍細胞と改変した線維芽細胞を混合した群	0.5	15.4	0.6	39.6	44.3

平均腫瘍サイズは、4週目の間に、腫瘍を計測したN枚の写真での値である。
この7-1(1)の図のマウスは、計測しなかった個体が含まれる。

4週間後、マウスのコントロール群の平均腫瘍サイズ(最長および最大幅の腫瘍軸の積として測定した)は 128mm^2 であり、これに比べて、DC/TKIL-2またはLNCX-IL2で形質導入した線維芽細胞と混合した腫瘍細胞を注射したマウス群では、それぞれ68および7mm²であった。これは、CT26のみまたは未改変線維芽細胞と混合したCT26で処理したマウスと比べて、IL-2処理した動物との間で高度に有意な差(補正 $\chi^2 = 18.89$, $p = 0.001$)が生じた。4週間後、同じ測定を行うと373,300および72mm²であった(表11)。最も発現性の高いベクター、LNCX-IL2は低発現性ベクターDC/TKIL-2よりも実質的により大きな腫瘍発生の阻害を引き起こしたことによく示し得る。腫瘍増殖の差を評価するために利用した多変量非母数統計手法(18, 20)により、4週間後、図2に示される4群に対する増殖曲線間で違いが著しく有意である($p < 0.001$)ことが証明された。統一してコントロールのアームとIL-2形質導入線維芽細胞を混合した腫瘍細胞を受けた動物との比較は、有意な差($P < 0.05$)を明らかにした。腫瘍細胞のみを注射した動物と未改変線維芽細胞を加えた腫瘍細胞を注射した動物との間の差は有意でないが、低IL-2発現線維芽細胞を受けた動物と高IL-2発現線維芽細胞を受けた動物との間の差($P = 0.05$)は有意であった。

1×10^5 個の生きている腫瘍細胞と混合した 2×10^6 個の改変線維芽細胞をマウスに注射すると、結果はより著しいものとなつた(図8および9、および表1-2を参照のこと)。4週間後、全てのコントロール動物で腫瘍が発達したのに対し、

DCTK-IL2またはLXSN-IL2ベクターで改変した線維芽細胞で処理した動物のそれぞれ11%および21%では、7週間後も腫瘍がないままである（実験は継続中）。さらに劇的に、最高IL-2生産ベクターであるLXCI-IL2ベクターで改変した線維芽細胞で処理した動物の75%は、7週間後も腫瘍が発生しないままである。これらのデータは、明らかに腫瘍の定着を防ぐためのIL-2の初期大量投与の重要性を証明する。

(以下余白)

図12
腫瘍の定着を防ぐためにIL-2を初期大量投与した場合。
1×10⁵個のCT26腫瘍細胞をBalb/cマウスに皮下注入した場合と比較した。

腫瘍細胞と混合した細胞	腫瘍細胞			腫瘍サイズ (mm ²)	平均腫瘍サイズ (mm ²)
	全数	陽性 (腫瘍あり)	陰性 (腫瘍なし)		
コントロール 細胞接着細胞	13	0	13	0.5	0.5
未改変細胞子細胞**	20	0	20	0.5	0.5
DCTK-IL2 細胞接着細胞	13	4	9	33.5	3.5
LXSN-IL2 細胞接着細胞***	13	4	11	27.5	2.5
LXCI-IL2 細胞接着細胞	3	0	3	7.5	2.5

- 平均腫瘍サイズは、4週間の間に、腫瘍を防ぐした組合の平均である。
- これらのデータの10%のカウントは、日陰で計った腫瘍内細胞が計算した。
- このデータの90%のカウントは、計測し得た腫瘍内細胞が算出した。
- *** このデータの90%のカウントは、計測し得た腫瘍内細胞が算出した。

追加のコントロールとして、遺伝学的にIL-2を発現するように改変したCT26細胞をマウスに注射した（結果は示していない）。1×10⁵個に達するまでのIL-2発現腫瘍細胞のBalb/cマウスへの注射では、腫瘍を発生しなかった。しかしながら、さらに多くの注射では、数匹の動物が腫瘍開始の遅れを伴って腫瘍を発生した。これらのデータは、文献(1)に報告されている結果を確認する。IL-2生産線維芽細胞の効果とIL-2生産腫瘍細胞とを比較するために、本発明者らは、DCTK-IL2ベクターで改変した2×10⁴個のCT26腫瘍細胞と1×10⁵個の未改変腫瘍細胞とを混合した。図10および表1-1、および表1-8は、DCTK-IL2改変腫瘍細胞が、腫瘍発生を防ぐのにいくぶん有効であることを示している。注射の4週間後、処理したアームの平均腫瘍サイズは303mm²であり、これに比べてコントロールのアームでは120mm²である。2-2週間後、1匹の動物(10%)が腫瘍がないままであるが、これに比べてコントロールのアームでは腫瘍がないものはない。別々の実験において、同じ条件下でDCTK-IL2改変腫瘍細胞で処理した動物に対するデータを、比較の目的で含有する。この比較は、DCTK-IL2改変腫瘍細胞が、DCTK-IL2改変線維芽細胞と同様の腫瘍定着に対する効果を有することを示唆する。

(以下余白)

図13
1×10⁵個のCT26細胞と混合して1×10⁴個のDCTK-IL2細胞を皮下注入した場合と比較した場合。
1×10⁵個のCT26細胞をBalb/cマウスに皮下注入した場合と比較した。

腫瘍細胞と混合した細胞	腫瘍細胞			腫瘍サイズ (mm ²)	平均腫瘍サイズ (mm ²)
	全数	陽性 (腫瘍あり)	陰性 (腫瘍なし)		
コントロール 細胞接着細胞	5	0	5	85	62.0 ± 17.0
未改変細胞子細胞	5	0	5	95	58.7 ± 6.0
DCTK-IL2 細胞	10	1	9	195	30.3 ± 17.0
CT26 細胞	4	2	6	255	63.8 ± 15.0
DCTK-IL2 改変 線維芽細胞	4	2	6	214	53.5 ± 15.0

- 平均腫瘍サイズは、4週間の間に、腫瘍を防ぐした組合の平均である。
- これらのデータの10%のカウントは、日陰で計った腫瘍内細胞が計算した。
- このデータの90%のカウントは、計測し得た腫瘍内細胞が算出した。

実施例VII(b)

全身的抗腫瘍免疫に対する線維芽細胞導入サイトカイン遺伝子治療の効果

Balb/cマウス群を、 2.5×10^5 個の放射線照射した腫瘍細胞の単独で、あるいは 2×10^6 個の形質導入または未改変線維芽細胞と混合した腫瘍細胞で免疫し、1週間後、反対の接種に 5×10^4 個の生きた腫瘍細胞で抗原投与した。これらの結果(図12および13、および表14)は、放射線照射した腫瘍細胞および形質導入線維芽細胞を用いた免疫化は、動物を生きた腫瘍細胞の抗原投与に対して防御するが、その防御は、放射線照射した腫瘍細胞単独または未改変線維芽細胞と混合した放射線照射した腫瘍細胞での免疫化により達成した防御よりわずかによいものであることを証明する。

(以下余白)

表14
マウスは、 5×10^5 個の放射線照射した腫瘍細胞に対する全身的抗腫瘍免疫の効果に、 2.5×10^6 個の形質導入または未改変線維芽細胞と混合した $\times 10^4$ 個の腫瘍細胞で免疫された。

被接種腫瘍細胞群上 混合した細胞群	被接種		腫瘍の 大きさ (mm) (mm ²)	腫瘍サイズ (mm ²)			平均腫瘍サイズ (mm ²)
	全数	腫瘍なし 数		101-200	201-300	>301	
コントロール群 ^a	70	0	0.5	0	0	—	1.0
未改変線維芽細胞 ^a	16	5	1.1	2	1	5	2.6 ± 2.7
未改変線維芽細胞と混合 した形質導入細胞群 ^b	15	4	1.1	0	—	—	2.6 ± 2.9
DCTK-L12 改変線維芽細胞 ^b	21	15	4.0	4	—	—	17.2 ± 19.4

平均腫瘍サイズは、4週目の時に、腫瘍を計測した群数の割合での値である。
これらのアームの1匹のマウスは、計測し得ない腫瘍群が存在した。

上記のプロトコールと類似の第二のプロトコールにおいて、動物を、線維芽細胞と混合した放射線照射した腫瘍細胞で免疫化し、2週間後、新鮮な腫瘍細胞で抗原投与した。図14および15、および表15に示すように、その結果は、放射線照射した腫瘍細胞と混合したDCTK-L12改変線維芽細胞が、放射線照射腫瘍細胞単独、未改変線維芽細胞と混合した放射線照射腫瘍細胞、またはLNCX改変線維芽細胞と混合した放射線照射腫瘍細胞よりも、統いて起る腫瘍の抗原投与に対して優れた防御をもたらすことを証明する。7週間後、コントロール動物の3分の1に比較して、DCTK-L12改変線維芽細胞で処理した10動物のうち7匹(70%)で腫瘍がないままである。4週間目、平均腫瘍サイズが、3つのコントロール群で180、170、および140mm²であるのに比較して、この群では41mm²であった。LNCX-L12改変線維芽細胞で処理した動物もまた、次の腫瘍細胞の抗原投与に対して防御されたが、結果はそれほど差しいものではなかった。この群において、54%の動物が腫瘍がないまま残っており、そして、4週間目のこの群の平均腫瘍サイズは86mm²であった。LXSH-L12改変線維芽細胞で処理した群中の腫瘍がない動物数は、その腫瘍が、その開始において若干遅れたが、コントロール群と同様であった。腫瘍の開始における速いを評価するのに利用した多変量非母数統計手法(19, 20)により、図15に示す6匹のアームについての速いは有意($p=0.012$)であることが証明された。それは、さらに生理食塩水で処理したコントロールのアーム、および放射

線照射腫瘍細胞単独、あるいは、未改変またはLNCXベクター改変線維芽細胞と混合した放射線照射腫瘍細胞を受けたアームが、統計的な群を形成したことを示した。放射線照射腫瘍細胞と混合したIL-2ベクター改変線維芽細胞を受けた8匹のアームにより、第二の異なる統計的な群を形成した。生理食塩水を注射したコントロールアームとIL-2形質導入線維芽細胞を混合した腫瘍細胞を受けた動物との間の以下の比較は、全てのベクターについて有意な差を示した($p<0.05$)。

(以下余白)

特表平7-503455 (26)

これらの結果は、サイトカイン遺伝子治療をする手段として、遺伝学的に改変した線維芽細胞を用いる可能性を証明する。全ての実験において、LNCX-IL2ベクターは、腫瘍症を防ぐのに優れていることがわかったが、一方、次の腫瘍の抗原投与に対する全身的防衛の調査においては、DCTE-IL2ベクターの方がよかったです。これらの対照的な効果は、多少驚くべきものであるが、CMVプロモーターは、インビオでは移植後5日で消えるが、一方、TKプロモーターはより長い期間活性を保すという観察により説明し得る。この見見の含む意味は、本願の遺伝子治療法を首尾よく適用するために、形質導入線維芽細胞中インビオで高レベルで持続的なIL-2発現をもたらすプロモーターを用いなければならないということである。

本研究成果から得られたデータは、直接または間接的に抗腫瘍効果を有する全てのサイトカインについて重要な意味を包含している。さらには、本データは、抗腫瘍効力がIL-2投与量に依存性であることを示唆する。したがって、より高レベルのサイトカイン分泌をもたらすベクターの構築は、本願の遺伝子治療法の適用に重要な進歩となる。

上記実施例中の括弧内の参考文献番号は、以下の参考文献リストと関連し、本明細書中に参考として援用されている。

(以下余白)

表15

全条件群免疫をもつて腫瘍細胞に対するIL-2抗原投与群と組合したマウスは、 25×10^6 個の荷物を腫瘍細胞で初期投与する6ヶ月前に、 25×10^6 個の荷物を腫瘍細胞で初期投与したマウスと比較して生存した。

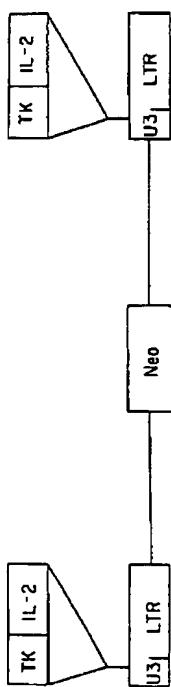
投与回数	全条件群免疫をもつて腫瘍細胞で初期投与するマウス		組合したマウス		平均腫瘍サイズ (mm ²)		>301
	25-100	101-200	201-300	>301	25-100	101-200	
1回目	135	0	2	-	265 ± 111	100 ± 151	
2回目	135	0	2	-	170 ± 160	170 ± 160	
3回目	135	0	2	-	160 ± 142	160 ± 142	
4回目	135	0	2	-	85 ± 112	85 ± 112	
5回目	135	0	2	-	111 ± 145	111 ± 145	
6回目	135	0	2	-	41 ± 35	41 ± 35	

平均腫瘍サイズは、4週目の間に、最大を許容した腫瘍の大きさの値である。
これらの下の1区のマウスは、前回しない腫瘍細胞が発生した。

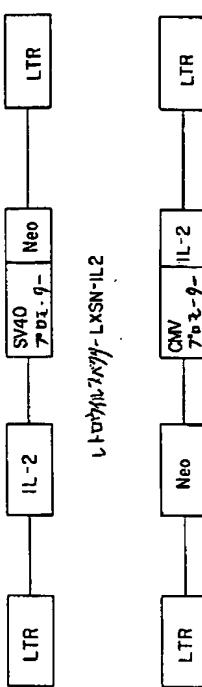
参考文献

- Gabrilove, J.L. 5 , Monogr. J. Natl. Cancer Inst. 14:73-7 (1990).
- Kelso, A., Current Opinion in Immunology, 2:215-25 (1989).
- Borden, E.C. 5 , Cancer, 65:800-14 (1990).
- Rosenberg, S.A. 5 , Ann. Intern. Med., 108:853-864 (1988).
- Lotze, M.T. 5 , JAMA, 255:3117-3124 (1986).
- Pizza, G. 5 , Lymphokine Research, 2:45-8 (1988).
- Sarma, G. 5 , Journal of Biological Response Modifiers, 9:81-6 (1990).
- Gandolfi, L. 5 , Hepato-Gastroenterology, 36:1352-6 (1989).
- Bubenik, J. 5 , Immunol. Letters, 19:279-82 (1988).
- Bubenik 5 , Immunol. Letters, 21:287-292 (1990).
- Pearson, E.R. 5 , Cell, 50:387-403 (1990).
- Gansbacher, B. 5 , J. Exp. Med., 172:1217-1224 (1990).
- Watanabe, Y. 5 , Proc. Natl. Acad. Sci., 86:9456-9460 (1989).
- Tepper, R.I. 5 , Cell, 57:503-512 (1989).
- Kriegler, M., Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, Stockton Press (1990).
- Rosenberg, S.A. 5 , N. Eng. J. Med., 320 (1989).
- Cornetta, K. 5 , Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 36:311-22 (1989).
- Hoover, H.C. 5 , Cancer Res., 44:1671-76 (1984).
- Sobol 5 , New Eng. J. Med. 316:1111-1117 (1987).
- Li Xu, 5 , Virology, 171:331-341 (1989).

本発明を、現在の好ましい実施態様の参考として記載しているが、本発明の意図から離れることなく種々の改変をなし得ることが理解されるべきである。したがって、本発明は次のクレームだけに限定される。



LXR-IL2



LSN-IL2

FIG. 1

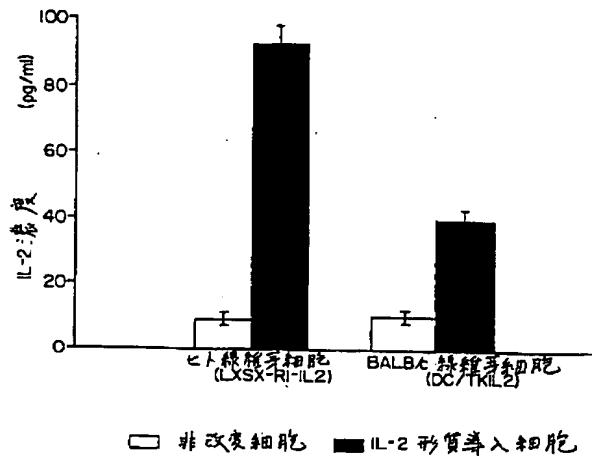


FIG. 2

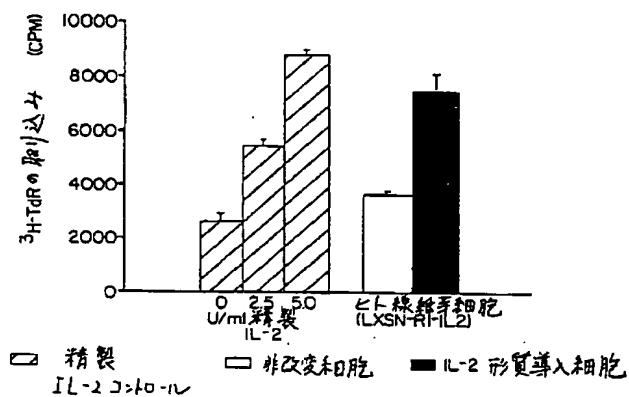


FIG. 3

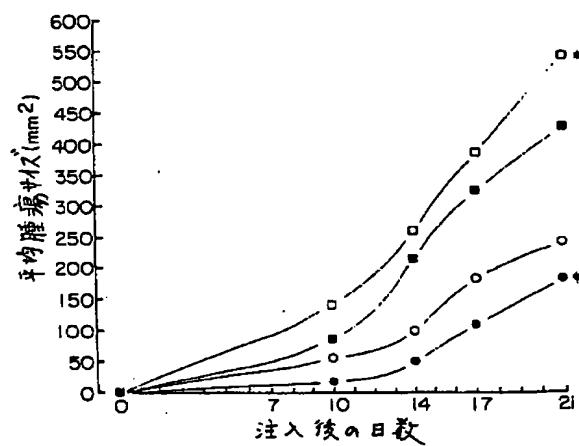


FIG. 4

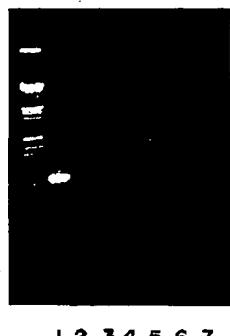


FIG. 5

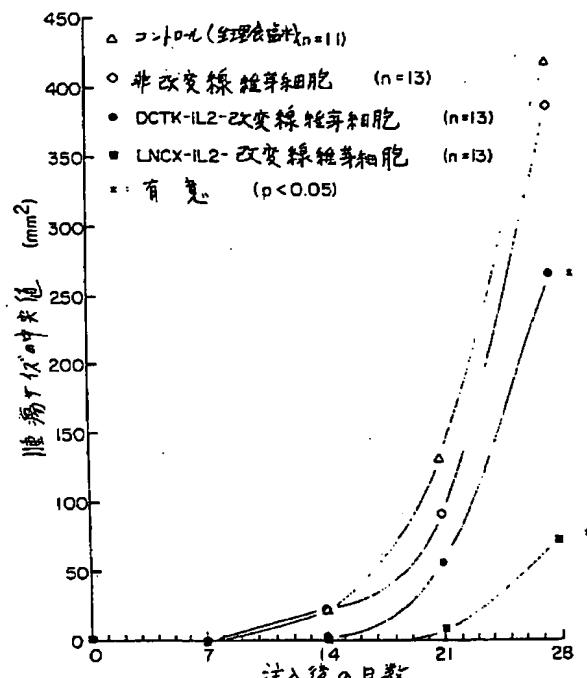


FIG. 6

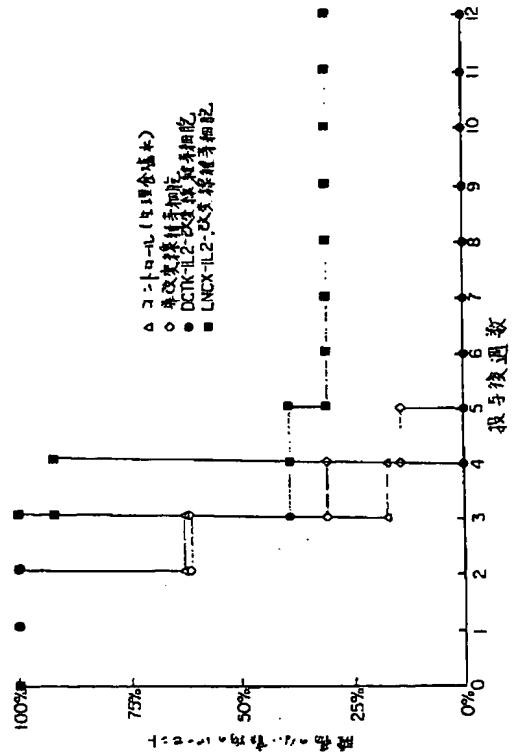


FIG. 7

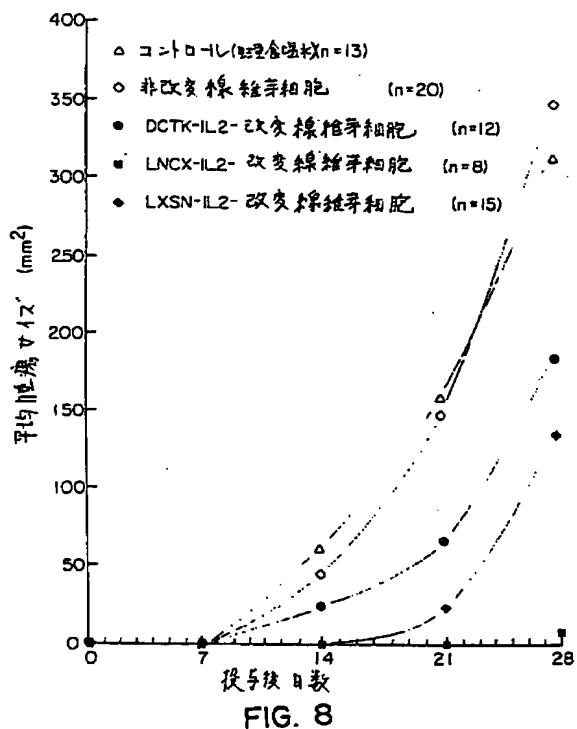


FIG. 8

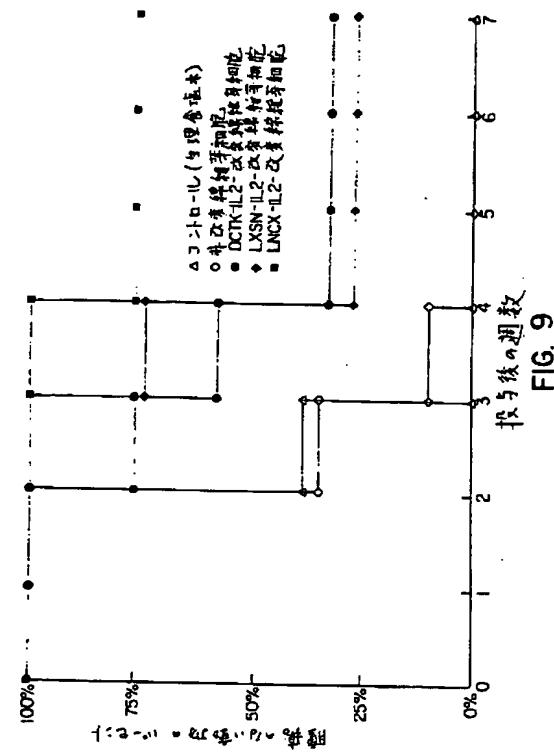


FIG. 9

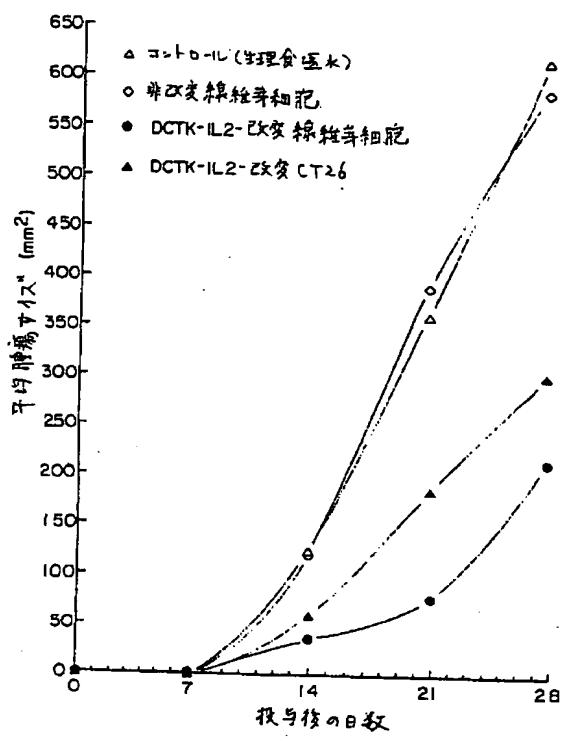


FIG. 10

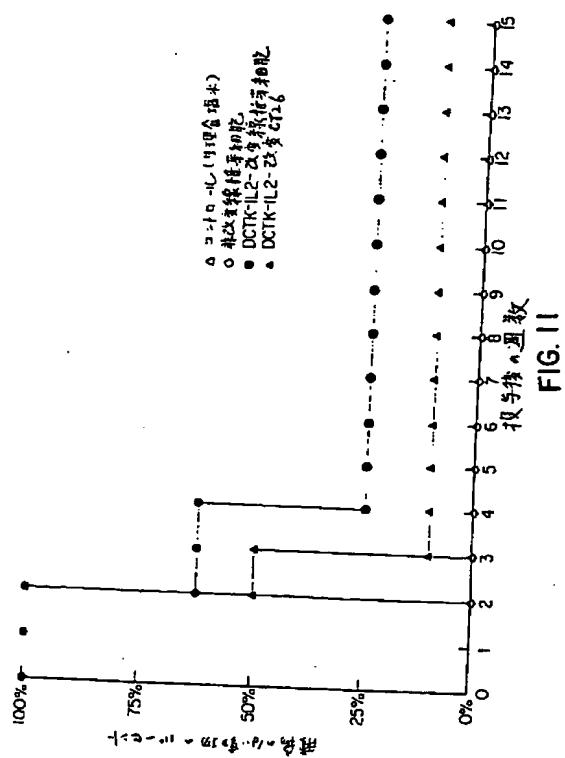


FIG. 11

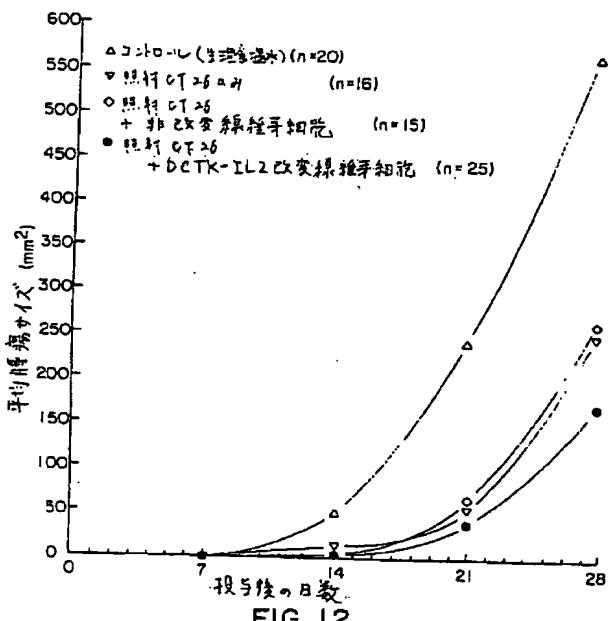


FIG. 12

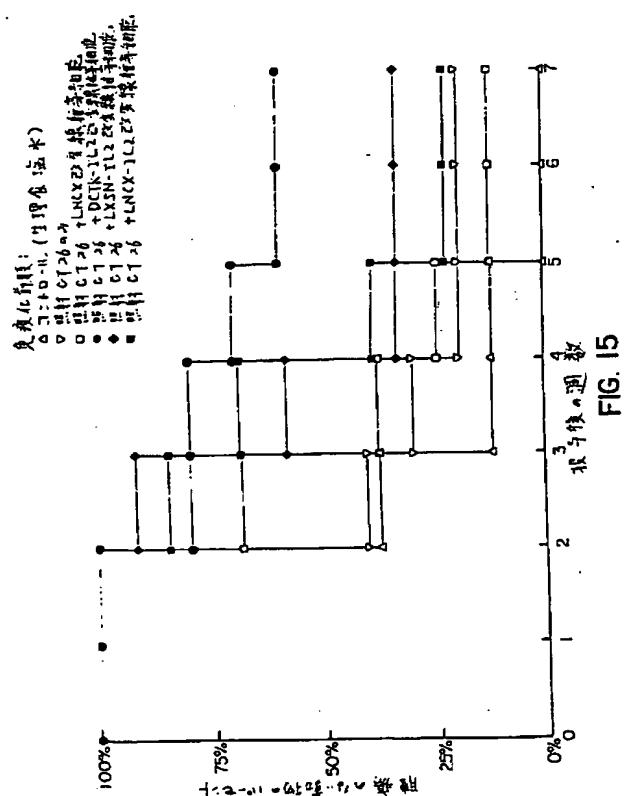


FIG. 15

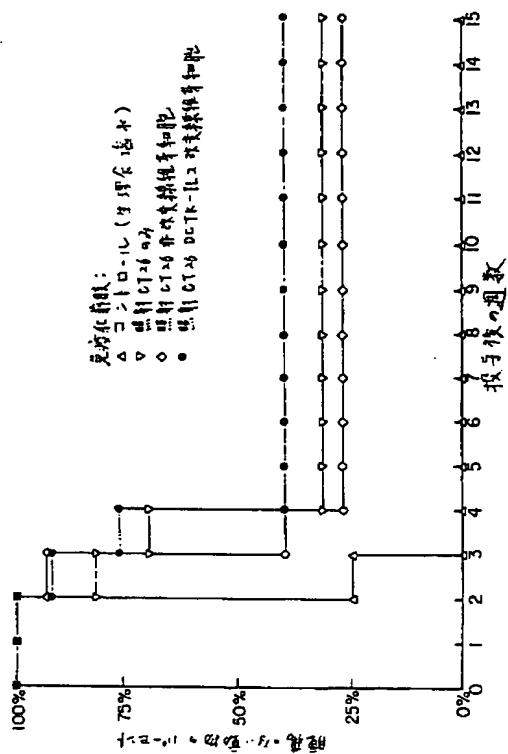


FIG. 13

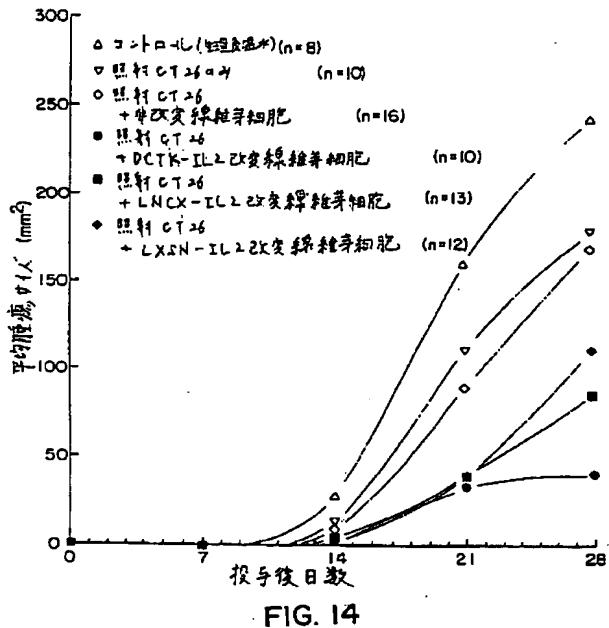


FIG. 14

補正書の写し（翻訳文）提出書（特許法第184条の8）

平成6年4月25日

特許庁長官記

1. 特許出願の表示

PCT/U.S92/08999

2. 発明の名称

癌のリンホカイン遺伝子導入

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サンディエゴ,

スイート 200, サイエンス パーク ロード 3099

名称 サンディエゴ リージョナル キャンサー センター

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 弁理士 山本秀策

電話(大阪) 06-949-3910



5. 補正書の提出年月日

1993年11月29日

6. 提出書類の目録

(1) 補正書の写し（翻訳文）

1通

研究の範囲

1. 被験体の癌を処置する方法であって、腫瘍性抗原、および、サイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたサイトカイン発現細胞を含有する製剤形態で、活動中の腫瘍部位以外の部位において、該被験体を免疫処置することにより、癌に対する該被験体の免疫応答を刺激する工程を包含し、ここで、該サイトカイン発現細胞が腫瘍細胞ではない、方法。

2. 前記被験体からあらかじめ単離された腫瘍細胞が、前記腫瘍性抗原を投与する。導入量は記載の方法。

3. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

4. 前記サイトカイン遺伝子が、インテロイキン-2である、請求項1に記載の方法。

5. サイトカイン発現細胞を生産するために、サイトカイン遺伝子が組換え法により細胞中に転移される、請求項1に記載の方法。

6. 前記サイトカイン遺伝子が、発現ベクター中に存在する構成要素に記載の方法

7. 前記発見ベクターが、自駆達伝子をさらに含有する。

インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびガンマインターフェロンからなる群から選択される。
請求項1に記載の相成物。

13. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項11に記載の組成物。

14. 前記サイトカイン遺伝子が、免疫応答を刺激するのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのには十分に低いレベルで発現される。構成因子に記載の組成物

15. 前記形質導入の工程において、前記レトロウイルス発現ベクターが、IL-2の持続分泌を引き起こすプロモーターを有する。請求項9に記載の方法。

16. 前記レトロウイルス発現ベクターが、1日につき10⁵個の細胞当たり約2ナノグラムから約160ナノグラムのIL-2の分泌を引き起こす。構成要素に組成の有無

特表平7-503455 (30)

請求項 6 に記載の方法。

8. 前記サイトカイン発現細胞が、線維芽細胞および抗原提示細胞から生産される、請求項5に記載の方法。

9. 癌に対する被験体の免疫応答を高める方法であって:

- a) 該被験体から線維芽細胞を単離する工程;
- b) インビトロで、該線維芽細胞を培養する工程;
- c) レトロウイルス発現ベクター中に、IL-2をコードする遺伝子および腫瘍性抗原をコードする遺伝子を含有するレトロウイルス発現ベクターを用いて、該線維芽細胞を形質化して、該線維芽細胞により、該腫瘍性抗原を発現し、そ該IL-2を発現および分泌する工程; および
- d) 活性腫瘍部位以外の部位において、免疫応答を高めに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのに十分なレベルでIL-2を発現し、そして該腫瘍性抗原を発現該線維芽細胞を用いて、該被験体を免疫処置する工程、
及ぶする、方法。

10. 前記繊維芽細胞が、自家遺伝子を発現するように、さらに改変される。請求項8に記載の方針。

1.1. 腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を高める組成物であって、該組成物が、腫瘍性抗原、および、サイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改変されたサイトカイン発現細胞を含有し、ここで、該サイトカイン発現細胞が腫瘍細胞ではない、組成物。

1.2. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、

SEARCHED		SEARCHED	SEARCHED
SERIALIZED		SERIALIZED	SERIALIZED
INDEXED		INDEXED	INDEXED
FILED		FILED	FILED
International application No. PCT/US99/07099			
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
(IPC) : Please See Specification US CL : Please See Specification			
According to International Patent Classification (IPC) or to high national classifications and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Mentioned documentations searched (classification system followed by classification numbers)			
U.S. : 434/720, 871, 871-435/200-2, 220-1, 40-3, 40-21, 50-32; 93/347, 23, 12, 37, 70, 71			
Documentations searched other than mentioned above (mention the date when documents are included in the file)			
Examiner does not remember during the unexamined search (name of date issued and, where practicable, search terms used): B1033, MEDLINE, ARI			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.	
X	Journal of Experimental Medicine, Volume 172, issued October 1990, Chantreuil et al., "Interleukin-2 Gene Transfer into Tissue Cells Alleviates Tumorogenesis and Induces Proliferative Capacity", pages 1217-1224, see the entire document.	1-2, 11-14 7, 18, 19, 24	
X	Cell, Volume 57, issued 05 May 1989, Tapparo et al., "Murine Interleukin-2 Displays Potent Anti-Tumor Activity In Vitro", pages 303-312, see the entire document.	1, 3-6, 8-11, 12-14 4, 13	
X	Cell, Volume 60, issued 09 February 1990, Pearce et al., "Interleukin-3 Production by Tissue Cells Expresses T-Helper Function in the Generation of an Antitumor Response", pages 297-307, see the entire document.	1-2, 8-11, 12-13 2, 6, 7, 14-16	
V	Cancer Research, Volume 50, issued 15 August 1990, Oguro et al., "Implementation of Genetically Manipulated Fibroblasts into Mice as Antitumor Adjuvants Therapy", pages 5102-5108, see the entire document.	B-16	
Further documentation is listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/>	See patent family section
Patent documents are listed in the continuation of Box C.			
Final examination of this application			
The following is the present status of the art which has been considered:			
In no case has any document been found which can be regarded as prior art against the claims in question.			
Other documents published or cited before the international filing date have been examined particularly as far as the unexamined part of the application is concerned, which were made available at priority date or earlier or at least three months before the international filing date.			
Other documents published or cited before the international filing date or later than the international filing date have been examined particularly as far as the unexamined part of the application is concerned, which were made available at priority date or earlier or at least three months before the international filing date.			
Other documents published or cited before the international filing date have been examined particularly as far as the unexamined part of the application is concerned, which were made available at priority date or earlier or at least three months before the international filing date.			
Other documents published or cited before the international filing date have been examined particularly as far as the unexamined part of the application is concerned, which were made available at priority date or earlier or at least three months before the international filing date.			
Date of the actual completion of the international search			
Date of mailing of the international search report 11 November 1993			
Name and mailing address of the ISA/Office of the Patent and Trademark Office (PTO) Washington, D.C. 20530			
Telephone No.: NOT APPLICABLE			
Authorized officer JACQUELINE STONE Telephone No.: (702) 308-1196			

国際調査報告		Int'l search report No. PCT/US92/0999
C (Continuing) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
X Y	Cancer Research, Volume 50, Issue 12 December 1992, Chaitin et al., "Recurrent Vaso-occlusive Injuries from Thrombotic Bone Marrow Osteonecrosis Pains and Long Lasting Anticoagulant Immunity", pages 7629-7632, see the entire document.	1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

国際調査報告		Int'l search report No. PCT/US92/0999
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (IPC Cl.)		
A61K 46/00, 35/12, 39/00, C12N 15/70, 15/24, 15/25, 15/26, 15/90, 15/92		
B. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: US CL.:		
434/93B, 97U, 89; 434/240.1, 220.1, 49.3, 49.53; 435/15, 12, 13, 27, 70, 71		

Form PCT/ISA/210 (sheet sheet) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.^a
// A 6 1 K 38/00
38/21

識別記号 庁内整理番号

F I

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, SE), CA, JP
(72) 発明者 ロイストン, アイバー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
ラ ホヤ, エル カミノ デル テアトロ
1515

(72) 発明者 フリードマン, シオドア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
ラ ホヤ, ラ ホヤ ショアーズ ドライ
ブ 9470

(72) 発明者 ファクライ, ハビーブ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92056,
オーシャンサイド, アベニダ アンダーンデ
1538

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成12年3月14日(2000.3.14)

【公表番号】特表平7-503455

【公表日】平成7年4月13日(1995.4.13)

【年通号数】

【出願番号】特願平5-507903

【国際特許分類第7版】

A61K 35/12 ADU
 31/70
 48/00
 // A61K 38/00
 38/21

【F I】

A61K 35/12 ADU
 31/70
 48/00
 37/02
 37/66

平成補正書

平成11年10月13日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成5年特許第507903号

2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121, サンディエゴ,

スイート 200, サイエンス パーク ロード 3099

名称 サンディエゴ リージョナル キャンサー センター

3. 代理人

住所 〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 弁理士 山本 英策

電話(大阪) 06-6949-3910



4. 補正対象部類名

請求の範囲および明細書

5. 補正項目名

請求の範囲および明細書

6. 補正の内容

6.1 請求の範囲を別紙のとおり補正します。

6.2 明細書を以下のとおり補正します。

6.2.1 明細書第45頁～第50頁に記載の表5を削除します。

請求の範囲

1. 脂溶性抗原に対する被膜体の免疫応答を高める組成物であって、該組成物が、脂溶性抗原、および、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子を発現するように遺伝的に改変されたサイトカイン発現細胞(CB細胞)を含有する、組成物。

2. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターフィロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびガムマイクーフェロンからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

3. 少なくとも1種のサイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項1に記載の組成物。

4. 各サイトカイン遺伝子が、免疫応答を刺激するのに十分であるが、実質的な全身的毒性和選択性を避けるのには十分に低いレベルで発現される、請求項1に記載の組成物。

5. 脂溶性抗原が、前記脂溶性抗原を提供する、請求項1に記載の組成物。

6. 前記サイトカイン遺伝子産物が、表現ベクターから発現される、請求項1に記載の組成物。

7. 前記発現ベクターが、自殺遺伝子を含有する、請求項6に記載の組成物。

8. 前記CB細胞が、純粋芽細胞から生産される、請求項1に記載の組成物。

9. 前記CB細胞が、抗原提示細胞から生産される、請求項1に記載の組成物。

1.0. 痘の治療として痘被膜体の免疫応答を刺激する薬物の開発における、請求項1から9のいずれか1項に記載の組成物の使用。

1.1. 痘に対する痘被膜体の免疫応答を刺激するための薬物として使用するための組成物の調製方法であつて、

- a) 痘被膜体から幹細芽細胞を単離する工程；
- b) インビトロで、該幹細芽細胞を培養する工程；
- c) インターコイキン-2をコードする遺伝子を含有するレトロウイルス発現ベクターを用いて、該幹細芽細胞を形成導入して、CF細胞を産生する工程；
- d) 痘被膜体から腫瘍細胞を単離する工程；
- e) 該腫瘍細胞の半細胞細胞を調製する工程；
- f) 該腫瘍細胞が増殖する能力を阻害する薬剤を用いて、該腫瘍細胞を処理する工程；および
- g) 該CF細胞および該処理された腫瘍細胞を含有する組成物を外方する工程、を包含する、がん。

1.2. 前記レトロウイルス発現ベクターが、目的遺伝子を含有する、請求項11に記載の方法。

1.3. 前記レトロウイルス発現ベクターが、インターコイキン-2の特異分離を引き起こすプロモーターを含有する、請求項11に記載の方法。

1.4. 前記レトロウイルス発現ベクターが、少なくとも4単位/日のインターロイキン-2の分離を引き起こす、請求項11に記載の方法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.